



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پیرا پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد (MSc) در رشته‌ی بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

شناسایی باکتری اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم توسط روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا

استاد راهنما:

دکتر حسین احمدپور یزدی

استاد مشاور:

دکتر امیر پیمانی

نگارش:

ناهید قربانزاده

سال تحصیلی ۹۶-۹۷



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## تقدیر و تشکر

با سپاس از خداوند بی همتا که آرامش قلبی ام تجلی گر حضور و یاری بی وقفه اش در تمام لحظات زندگی ام بوده است.

سپاس فراوان از جناب آقای دکتر حسین احمدپوریزدی که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند و در تمام مراحل انجام پروژه بنده را از راهنمایی های علمی سنجیده و بی دریغشان بهره مند ساختند.

سپاس از استاد مشاور، جناب آقای دکتر امیر پیمانی که با مشاوره های خویش پیمودن این مسیر را برای بنده تسهیل نمودند.

با تشکر از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه خانم ها شقایق پیشخوان دیبازر، کریمی و موسی خانی.

با تشکر از مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت حمایت مالی طرح با شماره مصوب ۲۸۲۰۱۳۵۷۶ تاریخ ۹۵/۱۲/۲۱.

## تقدیم

تقدیم به پدرم، پرمحتواترین کتاب زندگی که نگاه پرمهر و دستان گرمش همیشه نقطه ی پایان تمام نگرانی هایم بوده است.

تقدیم به مادر عزیزتر از جانم که تحقق تمام آرزوهایش در گرو خواستن ها و رسیدن های من معنا شده است.

تقدیم به همسفران مهربان زندگی ام، خواهر و برادران عزیزم که همیشه مرا از حمایت بی دریغشان بهره مند ساخته اند.



## چکیده

**سابقه و هدف:** اهمیت شناسایی باکتری اوره آپلازما اوره آلیتیکوم در ارتباط با نقش آن در فراهم کردن بستر بیماری‌های انتقال یافته از راه جنسی به ویژه ناباروری و سقط خودبه خودی برجسته می‌شود. علارغم وجود شماری از روش‌های کشت و روش‌های مولکولی جهت شناسایی این باکتری، حساسیت پایین، زمانبر بودن و هزینه‌ی بالای برخی از این روش‌ها نیاز به توسعه‌ی یک روش تشخیصی جایگزین مناسب را می‌طلبد. در این مطالعه یک حسگر تشخیصی DNA مبتنی بر نانوذرات طلا به کار گرفته شده است که در آن امکان آنالیز حالت‌های پراکنده و تجمعی نانوذرات به صورت بصری (قابلیت تفکیک چشمی رنگ) و طیف سنجی (به دلیل ظهور ویژگی‌های نوری آنها در محدوده‌ی طیف فرابنفش - نور مرئی) مبنای روش تشخیصی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** در این آزمایش نانوذرات طلا پس از ساخت، با یک پروب الیگونوکلوئیدی تیوله حاوی توالی اختصاصی نسبت به بخشی از توالی مولکول هدف کونژوگ گردید و سپس برای بررسی شبیهی از غلظت‌های (۶۰-۱۰ نانوگرم) محصول تکثیر شده قطعه‌ی ژنی اوره‌آز از سازه ژنی<sup>۱</sup> مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های حاصل از آنالیزهای رنگ سنجی و طیف سنجی شامل تغییرات موقعیت پیک پلاسمون، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه (FWHM)، شدت پیک و شدت تجمع نانوذرات برای تفسیر نتایج استفاده گردیدند.

یافته‌ها: نتایج مشاهدات بصری و نیز آنالیزهای طیف‌سنجی نشان دهنده‌ی حفظ رنگ و شدت تجمع پایین در نمونه‌های مثبت، پس از افزودن القاگر بود که مبین توانایی نانو پروب در شناسایی موفقیت آمیز مولکول هدف بود. محدوده‌ی تشخیصی استفاده شده در شیب غلظتی بین ۶۰-۱۰ نانوگرم از توالی هدف بود. در این محدوده با کاهش غلظت، میزان پایین هیبریداسیون به صورت افزایش جزئی شدت تجمع نانو پروب‌ها، پهنای پیک در

---

<sup>۱</sup> Plasmid Vector

نصف مقدار بیشینه، کاهش شدت پیک و نیز تغییر رنگ نسبی نانوپروب با یک روند وابسته به غلظت، قابل مشاهده بود. در مقابل نمونه‌های حاوی محصول غیرمرتبط و کنترل منفی به دلیل عدم هیبریداسیون نانوپروب با مولکول هدف افزایش چشمگیری در شدت تجمع، FWHM، جابه جایی پیک به سمت طول موج‌های بلندتر و نیز کاهش شدید شدت پیک را نشان دادند. مقایسه‌ی پارامترهای فوق بین نمونه‌های مثبت و کنترل منفی مبین تفاوت معنادار ( $P < 0.0001$ ) آنها بود. رنگ نمونه‌های کنترل نیز به طور کامل به طوسی تغییر یافت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** روش حاضر با برخورداری از اختصاصیت و حساسیت مطلوب با محدوده‌ی تشخیص<sup>۱</sup> ۱۰ نانوگرم از مولکول هدف یک روش تشخیصی کم هزینه، سریع و بدون نیاز به تجهیزات خاص را فراهم می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** نانوذرات طلا، اوره‌آپلازما اوره‌آلیتیکوم، رنگ سنجی

---

<sup>1</sup> Limit of detection

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل (۱-۱) مقدمه .....	۲
(۱-۱) بیان مسئله .....	۲
(۱-۱-۱) بیماری‌زایی باکتری <i>اوره‌آپلاسما</i> <i>اره‌آلینیکوم</i> .....	۴
(۲-۱-۱) اهمیت بالینی .....	۴
(۱-۲-۱-۱) ارتباط با ناباروری و پیامد های معکوس بارداری .....	۴
(۲-۲-۱-۱) ارتباط با بیماری های تنفسی نوزادان .....	۶
(۳-۲-۱-۱) ارتباط با نارسایی های کلیوی .....	۸
(۴-۲-۱-۱) ارتباط با سایر عفونت ها .....	۹
(۳-۱-۱) راهکار درمانی .....	۹
(۴-۱-۱) روش های تشخیصی .....	۱۱
(۱-۴-۱-۱) کشت .....	۱۱
(۲-۴-۱-۱) روش سرولوژیکی .....	۱۱
(۳-۴-۱-۱) تست های حساسیت آنتی بیوتیکی .....	۱۲
(۴-۴-۱-۱) روش های مولکولی .....	۱۳
(۵-۱-۱) نانو تکنولوژی .....	۱۴
(۱-۵-۱-۱) نانوذرات .....	۱۵
(۲-۵-۱-۱) نانوذرات فلزی .....	۱۶



۱۶.....	۱-۱-۵-۳) خواص نوری نانوذرات فلزی.....
۱۸.....	۱-۱-۵-۳-۱) انواع پلاسمون سطحی .....
۲۱.....	۱-۱-۵-۴) محاسبات کمی خواص نوری نانوذرات طلا .....
۲۲.....	۱-۱-۵-۴-۱) عوامل موثر بر پیک پلاسمون سطحی.....
۲۲.....	۱-۱-۵-۴-۱-۱) ثابت دی الکتریک محیط .....
۲۳.....	۱-۱-۵-۴-۲) شکل و اندازه ی نانوذرات.....
۲۴.....	۱-۱-۵-۴-۳) ترکیب نانوذرات .....
۲۵.....	۱-۱-۵-۵) ویژگی ها و کاربردهای نانوذرات طلا.....
۲۶.....	۱-۱-۵-۵-۱) روش های سنجش مواد بر پایه ی تشکیل نانوذرات فلزی .....
۲۷.....	۱-۱-۵-۵-۲) حسگرهای شیمیایی بر اساس تغییرات ضریب شکست محیط .....
۳۰.....	۱-۱-۵-۶) ویژگی های محلول کلئیدی طلا سیترا ته .....
۳۱.....	۱-۱-۵-۶-۱) عوامل موثر بر میزان تجمع نانوذرات .....
۳۱.....	۱-۱-۵-۶-۱-۱) اثر پتانسیل زتا .....
۳۲.....	۱-۱-۵-۶-۲) اثر الکترولیت ها .....
۳۳.....	۱-۱-۵-۶-۳) اثر دما .....
۳۴.....	۱-۱-۵-۶-۴) اثر اندازه و شکل نانوذرات .....
۳۵.....	۱-۱-۵-۶-۵) تاثیر PH .....
۳۶.....	۱-۱-۵-۶-۶) انواع رفتارهای تجمعی نانوذرات فلزی در محیط آبی .....
۳۷.....	۱-۱-۵-۶-۷) روشهای تشخیصی بر اساس تجمع نانوذرات فلزی .....
۳۷.....	۱-۱-۵-۶-۷-۱) ناپایدار کردن نانوذرات فلزی توسط الکترولیت ها .....
۳۸.....	۱-۱-۵-۶-۷-۲) روش های مبتنی بر تجمع نانوذرات جهت تشخیص اسیدنوکلئیک ها .....
۴۱.....	فصل ۲- بررسی متون .....

فصل-۳) مواد و روش ها.....	۵۵
۳-۱) اهداف و فرضیات.....	۵۵
۳-۱-۱) هدف کلی.....	۵۵
۳-۱-۲) اهداف اختصاصی.....	۵۵
۳-۱-۴) اهداف کاربردی.....	۵۵
۳-۱-۴) فرضیات و سوالات پژوهش.....	۵۵
۳-۱-۵) متغیرهای پژوهش.....	۵۶
۳-۲) نوع مطالعه.....	۵۷
۳-۳) جامعه ی مورد مطالعه.....	۵۷
۳-۶) تجهیزات مورد استفاده.....	۵۷
۳-۷) مواد و کیت ها.....	۵۹
۳-۸) محلول های مورد استفاده.....	۶۱
۳-۸-۱) بافر مخصوص شکستن پیوند دی سولفیدی.....	۶۱
۳-۸-۲) بافر شستشو.....	۶۱
۳-۸-۳) بافر نمکی.....	۶۲
۳-۸-۴) بافر تنظیم کننده ی فسفات.....	۶۲
۳-۸-۵) محلول سورفاکتانت.....	۶۲
۳-۸-۶) بافر سنجش.....	۶۲
۳-۸-۷) محلول دی تیوتریتول.....	۶۳
۳-۸-۸) محلول TBE.....	۶۳
۳-۸-۹) محلول سدیم سیتрат تری بازیک دی هیدرات.....	۶۳
۳-۸-۱۰) محلول هیدروژن تترا کلرواورات تری هیدرات.....	۶۳

۹-۳	پروب و پرایمرهای مورد استفاده	۶۴
۱۰-۳	حامل پلاسمیدی مورد استفاده	۶۶
۱۱-۳	روش و تکنیک اجرای مطالعه	۶۷
۱-۱۱-۳	تایید وجود ژن اوره‌آز در حامل پلاسمیدی	۶۷
۲-۱۱-۳	تکثیر قطعه‌ی ژنی غیرمرتبط	۶۹
۳-۱۱-۳	ساخت نانوذرات طلا	۷۱
۱-۳-۱۱-۳	بررسی اندازه‌ی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ عبوری TEM	۷۱
۲-۳-۱۱-۳	بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوذرات طلا	۷۲
۳-۳-۱۱-۳	بررسی ماکزیمم جذب نانوذرات	۷۲
۴-۳-۱۱-۳	تعیین غلظت و ضریب خاموشی	۷۲
۴-۱۱-۳	ساخت نانوپروب	۷۳
۱-۴-۱۱-۳	بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوپروب	۷۵
۲-۴-۹-۳	تعیین ماکزیمم جذب نانوپروب	۷۶
۳-۴-۹-۳	تعیین غلظت نانوپروب	۷۶
۴-۴-۱۱-۳	تایید اتصال پروب به سطح نانوذره	۷۶
۵-۱۱-۳	بهینه‌سازی روش تشخیصی	۷۶
۱-۵-۱۱-۳	بررسی میزان پایداری نانوپروب در برابر اثر القایی نمک منیزیم کلرید	۷۸
۲-۵-۱۱-۳	بررسی روش تشخیصی بر روی نمونه‌ی تکثیری	۷۸
۸۲	<b>فصل ۴) نتایج</b>	
۱-۱۱-۴	تایید وجود ژن اوره‌آز در حامل پلاسمیدی	۸۲
۲-۱۱-۴	تکثیر قطعه‌ی ژنی غیرمرتبط	۸۳
۳-۱۱-۴	ساخت نانوذرات طلا	۸۳

۸۴.....	۴-۱۱-۳) بررسی اندازه‌ی نانوذرات طلا با استفاده از میکروسکوپ عبوری TEM
۸۴.....	۴-۱۱-۳) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوذرات طلا
۸۵.....	۴-۳-۹) بررسی ماکزیمم جذب نانوذرات
۸۶.....	۴-۳-۱۱) تعیین غلظت و ضریب خاموشی نانوذرات
۸۶.....	۴-۳-۱۱) تعیین تعداد اتم نانوذرات طلا
۸۶.....	۴-۱۱-۴) ساخت نانوپروب
۸۷.....	۴-۱۱-۴) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوپروب
۸۸.....	۴-۴-۹) بررسی ماکزیمم جذب نانوپروب
۸۸.....	۴-۴-۱۱) تعیین غلظت نانوپروب
۸۹.....	۴-۴-۱۱) تایید اتصال پروب تیوله بر سطح نانوذرات
۸۹.....	۴-۱۱-۵) بهینه‌سازی روش تشخیصی
۸۹.....	۴-۱۱-۵) بررسی میزان پایداری نانوپروب در برابر اثر القائی نمک منیزیم کلرید
۹۰.....	۴-۱۱-۲) بهینه‌سازی روش تشخیصی بر روی محصول تکثیری
۹۱.....	۴-۱۱-۳) بررسی قابلیت نانوپروب در تشخیص DNA باکتری
۱۰۱.....	فصل (۵) بحث و نتیجه‌گیری
۱۰۱.....	۵-۱) بحث
۱۱۰.....	۵-۲) نتیجه‌گیری
۱۱۰.....	۵-۳) پیشنهادات
۱۱۱.....	۵-۴) منابع

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول (۱-۳) جدول متغیرها .....	۵۶
جدول (۱-۳) توالی پرایمر ها و پروب .....	۶۵
جدول (۲-۳) اطلاعات ضمیمه ی پروب سفارشی .....	۶۵
جدول (۳-۳) حجم و ترکیب واکنشگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن اوره آز .....	۶۸
جدول (۴-۳) برنامه ی زمانی مراحل PCR جهت تکثیر ژن اوره آز .....	۶۹
جدول (۵-۳) توالی پرایمرهای nuoD .....	۷۰
جدول (۶-۳) حجم و ترکیب واکنشگرهای مورد استفاده جهت تکثیر nuoD .....	۷۰
جدول (۷-۳) ( برنامه ی زمانی مراحل PCR جهت تکثیر nuoD .....	۷۱
جدول (۸-۳) اجزای آزمایش روش تشخیصی مبتنی بر نانوذرات طلا .....	۸۰
جدول (۱-۴) خصوصیات و تغییرات پیک پلاسمون نمونه ها .....	۹۷

## فهرست اشکال

### عنوان

### صفحه

شکل ۱-۱) تصویر شماتیک از برانگیختگی رزونانس پلاسمون سطحی مستقر.....	۱۹
شکل ۲-۱) محاسبه ی بهره وری نسبی نانوذرات کروی طلا از پیک های جذب، پخش و خاموشی طبق تئوری می.....	۲۰
شکل ۳-۱) پلاسمون سطحی انتشاری.....	۲۱
شکل ۴-۱) پیک خاموشی نانوذرات کروی طلا در قطر های مختلف.....	۲۲
شکل ۵-۱) نمایی از پدیده ی برانگیختگی رزونانس پلاسمون سطحی مستقر برای نانوذرات کروی و میله ای طلا.....	۲۴
شکل ۶-۱) طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوالیازهای طلا و نقره با نسبت های ترکیبی متفاوت از هر کدام.....	۲۵
شکل ۷-۱) هسته سازی یا رسوب کنترل شده ی یون های نقره توسط آنزیم گلوکز اکسیداز.....	۲۷
شکل ۸-۱) تاثیر تغییر ضریب شکست ناشی از افزودن آنالیت بر روی طیف جذبی نانومیله های استفاده شده برای شناسایی آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت ب.....	۲۸
شکل ۹-۱) لایه ی مضاعف الکتریکی محلول کلونیدی طلا در برگیرنده ی لایه ی جذب سطحی اولیه و لایه ی یون مخالف.....	۳۱
شکل ۱۰-۱) لایه های موجود بر روی نانوذره و محتوای باری هریک از آنها.....	۳۲
شکل ۱۱-۱) ترتیب هافمیستر نشان دهنده ی قدرت آبپوشی یونها.....	۳۳
شکل ۱۲-۱) تاثیر دما بر روی انرژی پلاسمون سطحی و پهنای پیک پلاسمون نانوذرات طلا در اندازه های مختلف.....	۳۴
شکل ۱۳-۱) اثر تغییرات pH بر روی پیک پلاسمون نانوذرات طلا.....	۳۶

- شکل ۱-۱۴) روش‌های تشخیصی مبتنی بر تجمع نانوذرات طلا جهت تشخیص اسید نوکلئیک‌ها ..... ۳۹
- شکل ۳-۱) اطلاعات مربوط به حامل پلاسمیدی و نیز توالی ژن اوره‌آز ..... ۶۶
- شکل ۳-۲) توالی ژنی محصول غیرمرتبط ..... ۶۹
- شکل ۴-۱) تصویرالکتروفورز مربوط به تایید وجود قطعه‌ی ژنی اوره‌آز در حامل پلاسمیدی و بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها در ژل ۱/۵٪ آگارز ..... ۸۲
- شکل ۴-۲) تصویرالکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه‌ی ژنی غیرمرتبط ..... ۸۳
- شکل ۴-۳) تصویر میکروسکوپ TEM از نانوذرات طلا ..... ۸۴
- شکل ۴-۴) تصویر توزیع اندازه‌ی نانوذرات طلا توسط DLS ..... ۸۵
- شکل ۴-۵) طیف جذبی نانوذرات طلا حاصل از اسپکتروفتومتر UV-Vis ..... ۸۵
- شکل ۴-۶) ساخت نانوپروب ..... ۸۷
- شکل ۴-۷) مقایسه‌ی توزیع اندازه‌ی نانوپروب به وسیله‌ی DLS ..... ۸۷
- شکل ۴-۸) مقایسه‌ی بین طیف‌های نانوپروب با نانوذره توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis ..... ۸۸
- شکل ۴-۹) بررسی اتصال پروب تیوله به سطح نانوذرات توسط DTT ..... ۸۹
- شکل ۴-۱۰) تاثیر حجم‌های مختلف محلول منیزیم کلراید ۰/۲ مولار بر روی نانوپروب ..... ۹۰
- شکل ۴-۱۱) تصویر مربوط تغییر رنگ نمونه‌ها پس از افزودن القاگر ..... ۹۵
- شکل ۴-۱۲) نمودار پاسخ به غلظت نمونه‌ها حاصل از آنالیز طیف سنجی توسط نانودراپ ..... ۹۶
- شکل ۴-۱۳) نتایج مربوط به آنالیز سطح معنی‌داری پارامترهای شدت تجمع نانوپروب در نمونه‌ها، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه و میزان جابه‌جایی پیک پلاسمون نمونه‌ها نسبت به کنترل منفی و شاهد (نانوپروب) ... ۹۹

## فهرست معادلات

عنوان

صفحه

معادله ی ۱-۳) محاسبه ی غلظت نانوذرات طلا	۷۲
معادله ۲-۳) معادله ی بیر-لامبرت	۷۳
معادله ی ۳-۳) محاسبه ی حجم مورد نیاز از محلول بافر تنظیم کننده فسفات	۷۴
معادله ۴-۳) محاسبه ی حجم مورد نیاز از محلول SDS	۷۴
معادله ۵-۳) محاسبه ی حجم مورد نیاز از بافر نمکی	۷۵
معادله ی ۱-۴) محاسبه ی تعداد اتم‌های نانوذرات طلا	۸۶



## فهرست اختصارات

bp	base pair	جفت باز
BPD	Bronchopulmonary dysplasia	دیسپلازی ریوی
CCC	Critical coagulation concentrations	غلظت انباشتگی بحرانی
CCU/ml	Colour changing units per mili liter	واحد تغییر رنگ به ازای هر میلی لیتر
CL	Crosslinking	شبکه‌ای
CLD	Chronic lung disease	بیماری ریوی مزمن
CSF	Cerebral spinal fluid	مایع مغزی-نخاعی
DLCA	Diffusion-limited cluster aggregation	تجمع خوشه محدود به انتشار
DLS	Dynamic Light scatter	پراکندگی نور جنبشی
DLVO	Derjaguin, Landau, Verway and Overbeek	-----
DNA-Nanoparticle	DNA-Np	کونژوگه‌ی الیگونوکلوئتید-نانوذره
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates	-----
DTT	Dithiothreitol	دی تیوتریتول
EDL	Electric double layer	لایه‌ی الکتریکی دوگانه
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	اتیلن دی آمید تترا استیک اسید
GOx	Glucose oxidase	گلوکوز اکسیداز
HBsAg	Hepatitis B virus surface antigen	آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت ب
HIV	Human immunodeficiency virus	ویروس نقص ایمنی انسانی

IAI	Intra amniotic infection	عفونت داخل پرده‌ی آمنیونی
IgA	Immunoglobulin A	پروتئین ایمنی نوع A
IgM	Immunoglobulin M	پروتئین ایمنی نوع M
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	تکثیر هم‌دمای میانجی شده با لوپ
LSPR	Localized surface plasmon resonance	رزونانس پلاسمون سطحی متمرکز
LOD	Limit of detection	محدوده‌ی تشخیصی
MBA	Multiple-banded antigen	آنتی‌ژن چندنواری
MIC	Minimum inhibitory concentration	حداقل غلظت مهارى
NCL	Non- Crosslinking	غیر شبکه‌ای
NFkB	Nuclear factor kappa B	فاکتور هسته‌ای کاپا بی
PCR	Polymerase Chain Reaction	واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی
PDI	Poly dispersity index	شاخص پراکندگی
PPLO	Pleuropneumonia-like organisms	موجودات شبه پلئورپنومونیا
PPROM	Preterm premature rupture of the membranes	از هم گسیختگی زودرس غشایی
PSA	Prostate-specific antigen	آنتی‌ژن اختصاصی پروستات
RCA	Rolling circle amplification	تکثیر دایره‌ی غلتان
RDS	Respiratory distress syndrome	سندرم زجر تنفسی
RLCA	Reaction-limited cluster aggregation	تجمع خوشه‌ی محدود به واکنش
RPA	Recombinase polymerase amplification	تکثیر پلیمرازی وابسته به آنزیم ریکامیناز
rpm	Round per minute	دور در دقیقه
SDS	Sodium dodecyl sulfate	تجمع خوشه‌ای محدود به واکنش
SMA	Spinal Muscular Atrophy	تحلیل عضلانی-نخاعی
SMN	Survival of motor neuron	ژن بقای نورون حرکتی
SPR	Surface Plasmon Resonance	رزونانس پلاسمون سطحی
STDs	Sexually transmitted disease	بیماری‌های انتقال یافته از راه جنسی
TEM	Transmission Electron Microscope	میکروسکوپ الکترونی عبوری
TEMED	Tetramethylenediamine	-----

TLR	Toll-like receptors	گیرنده‌های شبه تال
UU	Ureaplasma urealyticum	باکتری اوره آپلازما اوره آلیتیکوم

# فصل اول

## مقدمه

## فصل (۱-۱) مقدمه<sup>۱</sup>

### ۱-۱ بیان مسئله<sup>۲</sup>

اوره آپلازما / اوره آلتيكوم<sup>۳</sup> که به عنوان موجود شبه پلئوروپنومونیا<sup>۴</sup> (PPLO) نیز شناخته می شود، متعلق به خانواده ی مایکوپلازما و طبقه ی مولیکوتس<sup>۵</sup> بوده که بیواردو، جنس اوره آپلازما را به خود اختصاص داده است و ده مورد از چهارده سروتایپ این جنس را دربر می گیرد<sup>(۱)</sup>. این باکتری کوچکترین ارگانیسم با زندگی آزاد و خودهماندساز به شمار می رود. آنها با از دست دادن دیواره ی سلولی پتیدوگلیکانی از باکتری های گرم مثبت تکامل یافته اند فقدان دیواره در این ارگانیسم ها مسئول شماری از ویژگی های آنها نظیر: عدم حساسیت به آنتی بیوتیک بتالاکتام، ممانعت از رنگ آمیزی گرم و اشکال چند گانه ی آنها می باشد. این ارگانیسم همانند سایر مایکو پلازما ها، به منظور پایداری غشای سیتوپلاسمی نیازمند ساخت استرول هستند، ولی کوچک بودن اندازه ی ژنوم این باکتری منجر به وابستگی آنها در این مورد و نیز تامین بسیاری از نیازهای تغذیه ای، به توانایی بیوستتزی میزبان شده است<sup>(۲, ۳)</sup>. اوره آپلازما / اوره آلتيكوم به عنوان بخشی از فلور طبیعی دستگاه تناسلی با میزان استقرار ۸۰٪-۴۰٪ تلقی می شود، با این وجود این باکتری تحت شرایطی مانند به هم خوردن تعادل اسید-بازی موضع ویا سرکوب سیستم ایمنی می تواند به یک عامل بیماری زا تبدیل شود. نقش پاتوژنی این ارگانیسم برای اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط شپرد<sup>۶</sup> در بیمارانی با التهاب مجاری ادراری<sup>۷</sup> گزارش شد و طی مطالعات بعدی به عنوان شایع ترین مایکوپلاسمای تناسلی انسانی بیماری زا در هر دو گروه جنسی زنان و مردان شناخته شد<sup>(۴, ۵)</sup>. نقش

<sup>1</sup> Introduction

<sup>2</sup> Problem statement

<sup>3</sup> *Ureaplasma urealyticum* (UU)

<sup>4</sup> Pleuropneumonia-like organisms (PPLO)

<sup>5</sup> Mollicutes

<sup>6</sup> Shepard

<sup>7</sup> Urethritis

دوگانه‌ی فلور نرمالی و نیز ارتباط تنگاتنگ آن با تنوعی از شرایط بالینی که در اکثر موارد بدون علائم شیوع پیدا کرده و منجر به شرایط پاتوژنی متعاقب آن می‌شود، موجب توجه بیش از پیش محققین در شناسایی نقش سببی آن در ایجاد بیماری‌های عفونی به عنوان باکتری‌های پاتوژن فرصت طلب<sup>۱</sup>، به منظور به کارگیری تدابیر تشخیصی و درمانی زودهنگام قبل از پیش روی به شرایط حاد شده است. نتایج این تحقیقات نشان دهنده‌ی ارتباط این میکروارگانیسم با طیفی از شرایط بالینی نظیر: ناباروری، نتایج معکوس بارداری، التهاب اندومتريوم پس از زایمان، التهاب کوریوآمنیون، التهاب مجاری ادراری، ورم مفاصل، التهاب و بیماری‌های مزمن ریوی در نوزادان بوده است (۶، ۷). که به طور کلی در گروهی از بیماری‌ها با عنوان بیماری‌های انتقال یافته از راه جنسی<sup>۲</sup> (STDs) قرار می‌گیرند. STDs یک گروه از عفونت‌های وسیع و نسبتاً شناخته شده هستند این گروه از بیماری‌ها، معمولاً با یک وضعیت حاد مشخص شده که می‌توانند به شرایط مزمن بالینی پیشروی کنند. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی STDs در درجه‌ی دوم اهمیت بعد از سرطان، به عنوان بیماری‌های قابل درمان قرار گرفته‌اند. طبق تحقیقات مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها سالانه وقوع ۱۹ میلیون مورد جدید مبتلا به STD تخمین زده شد که نیمی از آنها در گروه سنی ۱۵-۲۴ سال قرار دارند (۸، ۹). میانگین شیوع جهانی این پاتوژن در افرادی بامشکل ناباروری، نتایج معکوس بارداری و التهاب مجاری ادراری ۵۰٪ - ۳۰٪ گزارش شده است (۱۰). در ایران نیز برای این باکتری در زنانی با مشکلات سقط خودبه‌خودی، ناباروری و مردانی با مشکل ناباروری به ترتیب فراوانی حدود ۱۶،۵٪، ۴،۲۸٪ و ۹٪ تخمین زده شده است (۶، ۱۱).

---

<sup>۱</sup>Opportunistic pathogens

<sup>۲</sup> Sexually transmitted disease

### ۱-۱-۱) بیماریزایی باکتری اوره آپلازما/آلتیکوم:

باکتری اوره آپلازما اوره آلتیکوم به طور معمول با کمک پروتئین های چسبندگی سلولی<sup>۱</sup> که در سطح آن بیان می شوند به سطوح موکوسی انواع سلول های انسانی مانند: اریتروسیت ها، اسپرماتوزوآ و سلول های مجاری ادراری متصل می شوند. فاکتور واگیری<sup>۲</sup> کلیدی آنها یک لیپوپروتئین سطحی به نام آنتی ژن چند نواری<sup>۳</sup> است، که مکانیسم عملکرد آن فعال سازی فاکتور هسته ای کاپایی<sup>۴</sup> (NFkB) به واسطه ی گیرنده های شبه تال<sup>۵</sup> (TLR) می باشد(۱۲). این باکتری فعالیت پروتئازی علیه ایمونوگلوبولین A<sup>۶</sup> نیز از خود نشان داده که می تواند IgA مخاطی را تخریب کند. از آنجایی که IgA ایمونوگلوبولین غالب ترشخی سطوح مخاطی است، پروتئاز IgA احتمالاً استقرار میکروارگانیزم ها را از طریق تخریب اجزای مهم سیستم ایمنی مخاطی تسهیل می کند. سایر فاکتورهای بیماریزایی این میکروارگانیزم شامل آمونیوم تولید شده از فعالیت اوره آزی، فسفولیپازهای A, C و توانایی تشکیل بیوفيلم می باشند(۱۳، ۱۴).

### ۱-۱-۲) اهمیت بالینی اوره آپلازما/آلتیکوم:

#### ۱-۱-۲-۱) ارتباط با ناباروری و پیامد های معکوس بارداری:

اکثر زنان دارای مشکلات ناباروری دچار تغییرات التهابی در لوله فالوپ و نواحی احاطه کننده ی صفاق ناشی از عفونت اوره آپلازما/آلتیکوم می باشند از این رو عفونت های مجاری تناسلی تحتانی ناشی از آن به طور مستحکم در ناباروری زنان مستدل شده است. علاوه بر آن ممکن است با ایجاد بیماری التهاب لگنی منجر به

<sup>1</sup> Cytadherence proteins

<sup>2</sup> Virulence factor

<sup>3</sup> Multiple-banded antigen (MBA)

<sup>4</sup> Nuclear factor kappa B (NFkB)

<sup>5</sup> Toll-like receptors (TLR)

<sup>6</sup> Immunoglobulin (IgA)

آسیب لوله های فالوپ و در نتیجه باعث بارداری خارج رحمی شوند (۶). همچنین حضور این عامل عفونی در نمونه های سمن افراد نابارور منجر به کاهش تحرک، سرعت پیشروی، قدرت حیاتی اسپرم و افزایش شمار لکوسیت ها و در نتیجه کاهش کیفیت و حجم سمن می شود، لکوسیت ها به عنوان منبع اصلی گونه های فعال اکسیژن تلقی شده، این عوامل از طریق پراکسیداسیون لیپید و از بین بردن تمامیت غشا باعث آسیب به اسپرم می شوند. همچنین ارتباط چشمگیری بین وفور این میکرو ارگانیسم ها با فقدان اسپرم در مایع سمن وجود داشته که این یافته ها به نقش آنها در ناباروری مردان اشاره دارد (۱۵، ۱۶). همچنین، این باکتری یکی از عوامل عفونت های جنینی بوده که با نتایج معکوس بارداری نظیر وقوع سقط خود به خودی، التهاب کوریو آمنیون، تولد زودرس خودبه خودی، از هم گسیختگی نابالغ و زودرس غشاها<sup>۱</sup> (PPROM) مرتبط بوده و از عاملین عمده ی بیماری و مرگ و میر در مراحل پیش از نوزادی به شمار می روند، مکانیسم های احتمالی شامل محصولات سمی میکروبی، عفونت جنینی - جفتی، عفونت اندومترיום و التهابات آبشاری طی بارداری می باشد (۴، ۱۷). اوره آپلازما به طور پیوسته با التهاب بافتی کوریو آمنیون مرتبط بوده، این ارگانیسم می تواند به حفره های آمنیونی تهاجم برده و برای هفته ها در آنجا به طور مداوم حضور داشته باشد و یک واکنش التهابی شدید بدون درد، زمانی که هنوز غشاها دست نخورده اند ایجاد کند. همچنین شناسایی آنها در بافت های رحمی اشاره به نقش آنها در تب بعد از زایمان یا سقط داشته است، عفونت داخل رحمی ناشی از این ارگانیسم یکی از عوامل عمده ی تولد زودرس به ویژه مواردی که در کمتر از هفته ی سی ام بارداری رخ داده اند می باشد. علاوه بر آن حضور درون رحمی آن با یک میزان افزایش یافته ی سیتوکاین ها، ماتریکس متالو پروتئیناز و پروستاگلاندین ها مرتبط بوده که احتمالاً همه ی آنها مسیر های سببی یا پیش ساز برای زایمان زودرس خودبه خودی و PPRM می باشند (۱۸، ۱۹).

---

<sup>۱</sup> Preterm premature rupture of the membranes (PPROM)



## ۱-۲-۲) ارتباط با بیماری های تنفسی نوزادان:

اوره آپلاسما با بیماری های ریوی نیز در ارتباط بوده به طوری که استخراج آن از تراشه های تنفسی بیش از ۴۰٪ نوزادان تازه متولد شده، ۲۴-۳۰ ساعت بعد از تولد و همچنین از خون مادر و بند ناف در زمانی مشابه گزارش شده است. این موارد نشان دهنده ی شواهدی مبنی بر انتقال عمودی و رخ داد عفونت در نوزادان تازه متولد شده می باشد. مولدینی با وزن تولد کمتر از ۱۰۰۰ گرم، زمانی که مادر با میزانی بیش از ۹۰٪ با باکتری کلونیزه شده باشد در مواجهه با خطر بالای عفونت هستند. بیماری زایی محتمل در این مورد شامل: مواجهه ی جنین با عفونت داخل رحمی رو به افزایش ناشی از اوره آپلاسما، عبور از یک کانال تولد آلوده و انتشار هماتوژن از جفت به بند ناف می باشند. از میان شایعترین بیماری های تنفسی نوزادان ناشی از عفونت اوره آپلاسما می توان به سندرم زجر تنفسی<sup>۱</sup> (RDS)، دیسپلازی ریوی<sup>۲</sup> (BPD) و پنومونی<sup>۳</sup> اشاره کرد (۲۰، ۲۱).

### سندرم زجر تنفسی:

یکی از عوامل عمده ی مرگ و میر در نوزادان نارس بوده که توسط عدم بلوغ قلبی به همراه کمبود سورفاکتانت در فضای آلوئول ها ایجاد می شود و اغلب با خون ریزی داخل بطنی، مجرای شریانی و بیماری های مزمن ریوی<sup>۴</sup> (CLD) مرتبط می باشد. در میان عوامل عفونی که در مجاری ادراری یا تناسلی تحتانی کلونیزه می شوند اوره آپلاسما ارتباط تنگاتنگی با پیشروی CLD داشته است (۲۲). نوزادان مبتلا به سندرم زجر تنفسی میزان افزایش یافته ی آنتی بادی علیه اوره آپلاسما را نشان داده و این پاتوژن از هر دو نمونه های درون نایی و مایع حلقی - بینی نوزادان مبتلا جداسازی شده است. پاتوژن جدا شده از ترشحات درون نایی نشان داد که عفونت جنین می

<sup>۱</sup> Respiratory distress syndrome (RDS)

<sup>۲</sup> Bronchopulmonary dysplasia (BPD)

<sup>۳</sup> Pneumonia

<sup>۴</sup> Chronic lung disease (CLD)

تواند در رحم رخ داده یا به طور متناوب توسط انتقال عمودی در حین تولد از مادر به نوزاد منتقل شده و باعث تحریک بلوغ نارس ریه و ابتلای نوزاد به بیماری مزمن یا دیسپلازی ریوی شود مکانیسم های درگیر در ایجاد RDS شامل ممانعت از سورفاکتانت ریوی با تولید فسفو لیپاز A2 توسط اوره آپلاسم ، افزایش تولید فاکتور های پیش التهابی نظیر: ایترلوکین ها و همچنین مولکولهای چسبندگی بین سلولی محلول می باشد که باعث آسیب ریه می شوند (۲۰).

### دیسپلازی ریوی:

یکی از بیماری های تنفسی است که نوزادان مبتلا، ۲۸ هفته بعد از تولد نیازمند مکمل اکسیژنی برای تنفس می باشند. دیسپلازی ریوی یک بیماری چند عاملی محسوب می شود ، نتایج به دست آمده از تعداد کثیری از مطالعات، نشان دهنده ی ارتباط مستقیم کلونیزاسیون اوره آپلاسم در مجاری تنفسی و پیشروی BPD بوده است (۲۳). طی مطالعات انجام شده مشخص شد که عارضه های تنفسی مرگ و میر ناشی از آنها در مواردی که به طور مداوم توسط اوره آپلاسم کلون شده اند به طور چشمگیری بالا بوده ، به طوری که خطر سایر پیامدهای BPD یا مرگ و میر ناشی از بیماری های ریوی در این نوزادان چهارونیم برابر بیشتر از نوزادانی است که فاقد کلونیزاسیون این باکتری در مسیرهای تنفسی خود می باشند. عفونت های پیش از نوزادی با این ارگانیزم احتمالا آبشارهای التهابی را در ریه افزایش و رشد آلئول ها را به طور مستقیم یا در ارتباط با اکسیدان ها و تهویه ی ناشی از آسیب به ریه مختل می کنند (۲، ۲۴).

## پنومونی:

نقش بالقوه ی باکتری اوره آپلاسم در ایجاد پنومونی با جداسازی ارگانیسم از ریه ی نوزادان مرده متولد شده<sup>۱</sup> مبتلا به این بیماری مشخص شد. شواهد نشان دهنده ی نقش سببی این باکتری در پنومونی مادرزادی شامل: استخراج باکتری از کشت خالص مایع آمنیونی، ریه ی آسیب دیده ی نوزادان ۱۴ ساعت پس از تولد به همراه یک پاسخ التهابی حاد و پاسخ اختصاصی ایمونوگلوبولین M<sup>۲</sup> (IgM) علیه اوره آپلاسم در نوزادان می باشند. بررسی های انجام شده با استفاده از رادیوگرافی قفسه ی سینه از نوزادان مبتلا، کلونیزاسیون این ارگانیسم را در مجاری تنفسی تحتانی آنها در مقایسه با نوزادانی که نتایج کشت آنها منفی بود نشان دادند. همچنین پنومونی در گروهی با نتایج مثبت کشت برای اوره آپلاسم، دو برابر حالت معمول بوده است. این یافته ها شروع یک پاسخ التهابی و آسیب ریه ی درون رحمی را پیشنهاد می دهند (۲۵).

### ۱-۲-۳) ارتباط با نارسایی های کلیوی:

اوره آپلاسم به طور مکرر از ادرار بیمارانی با سنگ های کلیوی عفونی نسبت به بیمارانی با سنگ های متابولیک جداسازی شده اند، این میکروارگانیسم ها با تجزیه ی اوره توسط آنزیم اوره آزیم اوره آز باعث متبلور شدن استروویت شده و خطر تشکیل سنگ های استروویت را به دلیل افزایش PH ادرار و آسیب مستقیم به سلول های اپی تلیال دستگاه های ادراری با تولید آمونیاک افزایش می دهند این باکتری ها در درزهای سنگ های ادراری جایی که عوامل ضد میکروبی توانایی نفوذ به آن را نداشته مستقر شده، از این رو عفونت مداوم منتج به رشد سریع سنگ ها و پر شدن همه یا بخش لگن خاصره ی کلیوی در مدت زمان چند هفته یا ماه می شوند. علاوه بر آن عفونت های ناشی از این میکروارگانیسم اختلالات مکرر مشاهده شده در بیماران همودیالیزی و پیوند کلیه بوده و یک فاکتور خطر

<sup>1</sup>Stillbirth

<sup>2</sup> Immunoglobulin M (IgM)

پراهمیت در رد پیوند و علت عمده ی مرگ و میر در این جمعیت می باشد. استعداد افزایش یافته به عفونت های شدید به دلیل تداخل ایمنی ایجاد شده توسط بیماری های ناشی از نقص سیستم ایمنی اولیه و سرکوب ایمنی است (۱، ۲۶).

#### ۱-۲-۴) ارتباط با سایر عفونت ها:

از موارد عفونی دیگری که نقش سببی اوره آپلازما در بیماری زایی آنها مشخص شده می توان به عفونت های سیستم عصبی مرکزی، باکتری، التهاب پروستات حاد و التهاب مجاری ادراری غیر کلامیدیایی<sup>۱</sup> و غیر گونوکوکی<sup>۲</sup> اشاره کرد (۲۷). همچنین یک مورد ابتلا به بیماری خود ایمن دیابت بی مزه و آرتریت واکنشی به دنبال عفونت با این باکتری گزارش شده است، در این مورد ایجاد پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن باکتری با تولید آنتی بادی های اختصاصی علیه سلولهای ترشح کننده ی هورمون ضد ادراری وازوپرسین مرتبط بوده که پیشنهاد دهنده ی حضور اپی توپ های مشترک آنتی ژنی در ساختار آنها می باشد به این ترتیب که عامل عفونی با به اشتراک گذاری ساختار مشابه با آنتی ژن های خودی باعث تحریک یا سرعت بخشیدن به بیماری خود ایمن می شود (۲۸). علاوه بر آن این میکرو ارگانیسم ممکن است استعداد ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی<sup>۳</sup> (HIV) یا ایدز را از طریق توسعه ی تکثیر ویروسی درون سلولهای التهابی با از هم گسیختن مخاط آنها افزایش دهد (۲۹).

#### ۱-۳-۱) راهکار درمانی:

گرچه ماکرولیدها<sup>۴</sup> به عنوان تنها عامل ضد میکروبی در دسترس برای درمان عفونت های ناشی از اوره آپلازما / اوره آلتیکوم در نوزادان شناخته شده اند، با این وجود در زمینه های بالینی تصمیم گیری در مورد اینکه کدام آنتی

<sup>۱</sup> Non-chlamydial

<sup>۲</sup> Non-gonococcal

<sup>۳</sup> Human immunodeficiency virus (HIV)

<sup>۴</sup> Macrolide

بیوتیک مورد استفاده قرار گیرد مشکل است. دوکسی سیلین به دلیل سمیت آن گزینه ی مناسبی نبوده، مگر در مواردی که باکتری از مایع مغزی\_نخاعی<sup>۱</sup> (CSF) جداسازی شده باشد. به این ترتیب ارائه ی پیشنهاد خاص برای درمان عفونت های اوره آپلاسمایی نوزادان یا زنان باردا دشوار است (۳۰). چرا که طیفی از بیماری های ناشی از این باکتری به طور کامل شرح داده نشده است و مطالعات بالینی که نشان دهنده ی کارایی موثر آنتی بیوتیک ها در داخل بدن<sup>۲</sup> باشند بسیار نادر هستند. بنابراین نه تنها محدودیت گزینه ی دارویی قابل انتخاب، بلکه علائم و نشانه های واقعی از شرایطی که تحت آن درمان باید ارائه شود، دوز داروی تجویزی و طول دوره ی درمان نیز از موارد چالش بر انگیز می باشند. آنتی بیوتیک درمانی یک روش درمانی استاندارد برای از هم گسیختگی زودرس غشاها می باشد، با این وجود رژیم های استاندارد برای ریشه کنی باکتری یا کاهش التهاب در حفره ی آمنیونی موفقیت آمیز نبوده است. در یک مطالعه ی تجربی بر روی عفونت درون آمنیونی<sup>۳</sup> (IAI) استفاده از آزیترومايسين به تنهایی یا به همراه دگزامتازون و ایندومتاسین مانع آسیب به ریه ی جنین شد. علی رغم حساسیت اوره آپلاسمای به اریترومايسين در شرایط آزمایشگاهی<sup>۴</sup>، استفاده ی بالینی از آن در هفته های اول پس از تولد نوزادان زودرس کلونیزه شده با این ارگانيسم، به منظور پیشگیری از BPD رضایت بخش نبوده است (۳۱). اخیرا در یک مطالعه نشان داده شده که استفاده ی پیشگیرانه از آزیترومايسين در یک مدل نوزادی مبتلا به عفونت اوره آپلاسمای، عفونت را کاهش و نتایج را بهبود داده است. این یافته ها پیشنهاد دهنده ی کارایی آزیترومايسين، در صورت تزریق آن بلافاصله پس از تولد است (۳۲).

---

<sup>۱</sup> Cerebral spinal fluid (CSF)

<sup>۲</sup> *In vivo*

<sup>۳</sup> Intra amniotic infection (IAI)

<sup>۴</sup> *In vitro*

#### ۱-۱-۴) روش های تشخیصی:

##### ۱-۱-۴-۱) کشت:

روش کشت ، استاندارد طلایی در تشخیص اوره آپلازما اوره آلیتیکوم محسوب می شود. محیط های کشت معرفی شده برای اوره آپلازما شامل: محیط آبگوشت SP4 و آگار، محیط آبگوشت 10B شپرد<sup>۱</sup> آگار و محیط آبگوشت PPLO و آگار می باشند. در این روش نمونه های پردازش شده برای تلقیح در محیط کشت ، به منظور جلوگیری از تداخل آنتی بادی ها ، آنتی بیوتیک ها و سایر مهار کننده ها و نیز غلبه بر کاهش سریع قابلیت زیست در کشت به صورت جزء به جزء مورد رقیق سازی قرار می گیرند. آبگوشت های تلقیح شده در ۳۷ درجه ی سانتیگراد در حضور فنل رد (معرف اسیدیت) انکوبه می شوند. سپس از باکتری های رشد کرده یک کشت مجدد<sup>۲</sup> در محیط آبگوشت بر روی آگار تهیه می شود. بالاترین رقتی که تغییر رنگ را نشان می دهد، مبین تعداد ارگانسم های حاضر در نمونه به صورت تغییر رنگ واحد در هر میلی لیتر<sup>۳</sup> می باشد. با وجود اینکه کشت از اختصاصیت مناسب و هزینه ی نسبتاً پایینی برخوردار بوده ، ولی دارای معایبی نظیر: زمانبر بودن ، مستعد به آلودگی ، حساسیت پایین و نیز عدم توانایی در تمایز سروارها می باشد (۳۳، ۳۴).

##### ۱-۱-۴-۲) روش سرولوژیکی:

روش پیشنهادی دیگر برای تشخیص اوره آپلازما روش سرولوژیکی و به طور عمده تکنیک های میکروایمونوفلورسنس<sup>۴</sup>، مهار متابولیسم<sup>۵</sup> و الیزا<sup>۶</sup> می باشد. اما نقش فلور نرمالی این باکتری در افراد سالم ، تفسیر

<sup>1</sup> Shepard's 10 B broth

<sup>2</sup> Subculture

<sup>3</sup> Colour changing units per mili liter (CCU/ml)

<sup>4</sup> Micro immunofluorescence

<sup>5</sup> Metabolism inhibition

<sup>6</sup> Enzyme immunoassay

تیتراژ آنتی بادی علیه آن را در نمونه های بالینی با مشکل مواجه می کند. از معایب دیگر این روش می توان به نیاز IgG و IgM دوران نقاهت جهت تایید تغییرات سرمی همزمان ایمونوگلوبولین های به نمونه های سرمی حاد و مشکل در تمایز عفونت های جدید از عفونت های قبلی ، زمانبر بودن و واکنش متقاطع با سایر ارگانیزم ها اشاره کرد. علاوه بر آن هیچ ارزیابی سرولولژیکی برای اوره آپلازما به صورت استاندارد تعریف نشده است (۴, ۱۴).

#### ۱-۱-۴-۳) تست های حساسیت آنتی بیوتیکی:

چندین روش تست حساسیت آنتی بیوتیکی برای اوره آپلازما استفاده می شود که نمونه هایی از آنها شامل:

رقیق سازی میکرو آبگوشت<sup>۱</sup> ، روش رقیق سازی آگار<sup>۲</sup> و E test می باشند.

#### \_\_ روش رقیق سازی میکرو آبگوشت:

این روش از یک پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه ای حاوی غلظت های رو به کاهشی از آنتی بیوتیک که با غلظت استاندارد (۱۰<sup>۴</sup> میلی لیتر) از ارگانیزم ها در محیط آبگوشت مخلوط شده، استفاده کرده و ترکیب حاصل انکوبه می شود. محیط مورد استفاده ، آبگوشت 10B یا PPLO حاوی اوره می باشد. این روش امکان ارزیابی چندین آنتی بیوتیک را در یک پلیت میکروتیتر مشابه فراهم می کند. اما از آنجایی که زمان قرائت و مقدار تلقیح ، ارزیابی را تحت تاثیر قرار می دهند این روش نیازمند استاندارد سازی است، و نیز احتمال آلودگی با ارگانیزم های ناهمگون مقاوم به آنتی بیوتیک هم وجود دارد. (۳۵).

---

<sup>۱</sup> Broth micro-dilution method

<sup>۲</sup> Agar dilution method

## - روش رقیق سازی آگار:

روش رقت آگار برای تعیین حداقل غلظت مهاري<sup>۱</sup> MIC، مبتنی بر تلفیق رقت های دو برابری عوامل ضد میکروبی با پلیت های آگار ذوب شده است که هر پلیت دربر گیرنده ی غلظت های متفاوتی از عوامل ضد میکروبی است. محیط های A8 و PPLO برای این منظور می توانند استفاده شوند. (۳۶). از معایب این روش می توان به عدم وجود هیچ گونه راهنمای جامع از هیچ نمایندگی تنظیمی برای اجرا و نیز تفسیر نقاط انفصال MIC اشاره کرد (۱۴, ۳۷).

### ۱-۴-۴) روش های مولکولی :

روش های مولکولی مورد استفاده جهت شناسایی اوره آپلازما شامل PCR<sup>۲</sup> و real-time-PCR می باشند.

- روش PCR بر اساس تکثیر قطعه ی ژنی مرتبط با پاتوزن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بوده که متعاقباً جهت آشکارسازی قطعه ی تکثیر شده با ژل الکتروفورز همراه می شود (۳۸).

- روش real-time PCR یک سیستم شناسایی کمی مبتنی بر تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به همراه یک پروب فلورسنت مکمل بخشی از ژن هدف می باشد. در این روش فعالیت آنزیمی جهت تکثیر سبب تجزیه ی پروب و ایجاد سیگنال شده که در نهایت یک مقدار کمی از قطعه ی هدف به دست می دهد. گرچه روش real-time PCR به دلیل دارا بودن مزایایی نظیر: تکثیر و شناسایی همزمان توالی اختصاصی DNA، تعیین کمیت دقیق هدف آغازی، حساسیت و اختصاصیت بالا و خطر آلودگی پایین جایگزین روش PCR مرسوم شده است، با این

<sup>۱</sup> Minimum inhibitory concentration (MIC)

<sup>۲</sup> Polymerase Chain Reaction (PCR)



وجود مواردی نظیر: نیازمندی به واکنشگرهای اختصاصی، تجهیزات گران قیمت و پرسنل متخصص از جمله محدودیت های آن به شمار می روند (۳۹).

همانطور که در بخش های قبلی بیان شد تاکنون تعدادی از روش های تشخیصی جهت شناسایی باکتری اوره آپلازما اوره آلیتیکوم توسعه یافته و به کار گرفته شده اند، ولی با این وجود این روش ها به دلیل دارا بودن یک سری کاستی ها (۱-۱-۴) از لحاظ حساسیت و اختصاصیت تشخیصی یا هزینه ی بالای تجهیزات مورد استفاده و نیز نیاز به پرسنل متخصص در این زمینه، تشخیص به موقع و دقیق این باکتری را با مشکل مواجه می سازند. از این رو فناوری نانودر طی سال های اخیر پیشرفت های عظیمی در تشخیص های مولکولی به ارمغان آورده است که در این میان سیستم های رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا با فراهم کردن امکان تشخیص ساده، سریع، دقیق و مقرون به صرفه، به عنوان روش جایگزین به طور گسترده ای جهت شناسایی و تعیین ویژگی پاتوژن ها مورد استفاده قرار گرفته است.

#### ۱-۱-۵) نانوتکنولوژی :

در سال ۱۹۵۹ ریچارد فاینمن فرآیندی را که امکان ساخت ماشین های مولکولی با دقت اتمی را فراهم می آورد، توصیف کرد (۴۰). و اریک درکسلر در سال ۱۹۸۶ با تکمیل توصیف های فاینمن اصطلاح نانوتکنولوژی را برای این فرآیند به کار برد. در واقع نانوتکنولوژی به دانش طراحی و تولید ساختارها، ابزار و سیستم ها در مقیاس نانو از طریق تغییر مواد در سطوح اتمی و مولکولی اشاره دارد که در مواجهه با محرک های خاص پاسخ های معینی از خود بروز می دهند. یک نانومتر برابر با  $10^{-9}$  متری باشد که می تواند به صورت مقایسه ی ابعاد یک گوی شیشه ای کوچک در برابر ابعاد کره ی زمین نیز بیان شود. خواص بروز یافته از مواد در مقیاس نانو یا نانوذرات منجر به کاربرد آنها در طیف وسیعی از زمینه ها نظیر طراحی و ساخت برنامه های کامپیوتری، نساجی، غذا

(کشاورزی)، دامپزشکی، مراقبت های بهداشتی و زیست پزشکی (اعضای مصنوعی، دارو رسانی و تشخیص) شده است (۴۱، ۴۲).

#### ۱-۱-۵) نانوذرات:

نانوذرات، به طور معمول به عنوان ذراتی با ابعاد کوچک تر از ۱۰۰ نانومتر تعریف می شوند. آنها از مواد مختلفی تشکیل شده و در اندازه، شکل (کروی، میله ای، سه گوش و غیره)، ویژگی های سطحی و برهم کنش با سیستم های زیستی با یکدیگر متفاوت هستند (۴۳). شکل تجاری رایج نانوذرات اغلب به صورت پودر خشک بوده، همچنین نانوذرات به صورت سوسپانسیون در محلول های آلی یا آبی نیز مورد توجه هستند (۴۴). نانوذرات به دلیل برخورداری از یک سری ویژگی های مرتبط با اندازه و رفتار سطحی آنها، به طور وسیعی در تشخیص مولکول های زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها و آنتی بادی ها به کار گرفته شده اند. از جمله ویژگی های برجسته کننده ی نانوذرات به عنوان وسیله ی تشخیصی می توان به پایداری ساختاری، قابلیت اتصال به مولکول هدف، اندازه ی بسیار کوچک (۱۰۰-۱ نانومتر)، نسبت بالای سطح به حجم و خصوصیات نوری، الکتریکی و مغناطیسی (وابسته به اندازه، شکل و ترکیب) آنها اشاره نمود (۴۵). ویژگی های ذکر شده منجر به استفاده از نانوساختارها در روش های تشخیصی مختلف نظیر روش های مبتنی بر نور سنجی<sup>۱</sup>، رنگ سنجی<sup>۲</sup>، الکتریکی و الکتروشیمیایی<sup>۳</sup> (هدایت سنجی) و طیف سنجی<sup>۴</sup> شده است. از جمله نانو ساختارهای مورد استفاده در تشخیص زیست مولکول ها شامل نانوذرات مغناطیسی، نقاط کوانتومی، نانوسیم ها، نانولوله ها و نانوذرات فلزی می باشند

---

<sup>1</sup> Optical

<sup>2</sup> Colorimetric

<sup>3</sup> Electrical and Electrochemical

<sup>4</sup> Spectroscopy

(۴۴, ۴۶). به دلیل استفاده از نانوذرات فلزی در این تحقیق، ویژگی های آنها با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفته است.

### ۱-۱-۵-۲) نانوذرات فلزی:

نانوذرات فلزی شکل پودری فلزات جامد بوده و می توانند از یک نوع یا آلیاژی از چند نوع فلز باشند. کاهش اندازه ی فلزات در مقیاس نانو، اغلب منجر به ظهور پدیده های منحصر به فرد ناشی از اثرات رزونانس آنها(به ویژه پدیده های مرتبط با خواص نوری آنها) می شود که در فلزات حالت توده قابل مشاهده نمی باشند، از این رو مسئول اکثر ویژگی های کاربردی نانوذرات خاصیت نوری و برهمکنش آنها با نور می باشد. در این میان در دهه های اخیر، نانوذرات فلزی طلا و نقره به دلیل خواص نوری برجسته ی ناشی از تغییر شکل، اندازه و ترکیب آنها و نیز سمیت پایین و زیست سازگارپذیری بالا، در زمینه های تحقیقاتی مختلف جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده اند(۴۷). مثال های رایج و قدیمی استفاده از ویژگی های رزونانس این نانوذرات، کاربرد آنها در رنگ آمیزی سرامیک ها و شیشه آلات می باشند(۴۸).

### ۱-۱-۵-۳) خواص نوری نانوذرات فلزی:

بارزترین ویژگی مرتبط با پدیده ی نوری نانوذرات فلزی رزونانس پلاسمون سطحی<sup>۱</sup> (SPR) این ذرات می باشد، که از نوسان جمعی الکترون های آزاد هدایت فلز در اثر برخورد با نور ایجاد شده و مسئول تغییر رنگ این نانوذرات می باشد. این نانوذرات دارای جذب نوری قوی وابسته به SPR در ناحیه ی مرئی و فرابنفش طیف الکترومغناطیس هستند که باعث ایجاد طیف جذبی قوی برای آنها در این ناحیه می شود. پیک پلاسمون و رنگ نانوذرات تحت تاثیر شکل و اندازه ی آنها بوده و با تغییر این پارامترها دچار تغییر می شوند (۴۹). در واقع خروج شماری از

<sup>۱</sup> Surface Plasmon Resonance (SPR)

الکترون های هدایت از حالت تعادل سبب وقوع پدیده ی پلاسمون<sup>۱</sup> می شود. به گونه ای که با برخورد تابش الکترومغناطیسی، حرکت این الکترون ها تحت کنترل میدان الکتریکی قرار می گیرد و با یک فرکانس پلاسمایی خاص نسبت به هسته با بار مثبت ارتعاش می کنند، ارتعاش این پلاسمای کمی را پلاسمون می نامند. فرکانس نور برخوردی، فرکانس طبیعی نوسان الکترون های سطحی را در برابر جاذبه ی آنها نسبت به هسته ی مثبت توصیف می کند. فرکانس این پلاسمون تحت تاثیر عواملی نظیر چگالی الکترون ها<sup>۲</sup>، مقدار موثر الکترون ها<sup>۳</sup>، شکل و اندازه ی توزیع<sup>۴</sup> بار قرار می گیرد (۵۰، ۵۱). در مقایسه با اکثر فلزات گروه واسطه<sup>۵</sup> که دارای یک پیک ضعیف و پهن در محدوده ی ناحیه ی فرابنفش می باشند، فلزات نجیب<sup>۶</sup> مانند طلا، نقره و مس یک پیک پلاسمون قوی در ناحیه ی مرئی طیف الکترومغناطیس به خود اتخاذ می کنند. خواص نوری نانوذرات فلزی علاوه بر الکترون های آزاد هدایت به ماهیت گذارهای بین باندي<sup>۷</sup> نیز بستگی دارد به طوری که نانوذرات مس با دارا بودن گذارهای بین باندي قوی که با انرژی های رزونانس هم پوشانی دارند یک پاسخ نوری کاهش یافته از خود بروز می دهند که به صورت ضعیف و پهن شدگی پیک نمایان می شود (۵۲). از طرف دیگر جدائی ایندو مولفه از یکدیگر در نانوذرات طلا و نقره باعث شده که گذارهای بین باندي تاثیر منفی کمی بر روی شدت پیک رزونانس داشته باشد و در نتیجه الکترون های آزاد هدایت آزادی تحرک بیشتری داشته و با پلاریزاسیون بالایی که ایجاد می کنند باعث تشکیل پیک پلاسمون در فرکانس های بالا با پیک باریک می شوند. از آنجایی که مقاومت فلزات طلا و نقره در برابر اکسیداسیون نسبت به مس بالا بوده، استفاده از این نانوذرات در روش های مبتنی بر نور ترجیح داده می شود. نانوذرات فلزی به ویژه طلا با ضریب خاموشی<sup>۸</sup> پیک جذبی رزونانس پلاسمونی تقریبی برابر با

<sup>1</sup> Plasmon

<sup>2</sup> Density of electrons

<sup>3</sup> Effective electron mass

<sup>4</sup> Shape and size of the charge distribution

<sup>5</sup> Transition metals

<sup>6</sup> Noble metals

<sup>7</sup> Interband transitions

<sup>8</sup> Extinction coefficient

$10^{-10}$  تا  $10^{-9}$  بر مول در سانتیمتر مربع و یک سطح مقطع بزرگتری نسبت به رنگ دانه های جاذب قوی، در روش های رنگ سنجی مورد استفاده قرار می گیرند (۵۳).

### ۱-۱-۵-۳) انواع پلاسمون سطحی :

پلاسمون سطحی بر سه نوع پلاسمون سطحی آکوستیک، مستقر و انتشاری می باشد که به اقتضای کاربرد آنها در این تحقیق به توضیح دو مورد اخیر پرداخته می شود.

الف) پلاسمون سطحی مستقر<sup>۱</sup>: برانگیختگی نوری پلاسمون سطحی در حجم های کوچک نظیر نانوذرات فلزی منجر به ایجاد سلول های فضایی در مقیاس نانو از میدان های الکترو مغناطیسی می شود. این میدان های موضعی زمانی که طول موج های نور زمینه با فرکانس پلاسمون الکترون های هدایت آن ذره منطبق باشد به یک حداکثر می رسند که با عنوان رزونانس پلاسمون سطحی مستقر<sup>۲</sup> (LSPR) شناخته می شود. در نانوذرات پلاسمونی، این LSPR یک پیک جذبی مشخص در محدوده ی فرکانس مرئی و میدان های الکترومغناطیسی قوی در سطح ذره به دست می دهد که حجم موضعی پیرامون نانوذره را با جابه جایی الکترون های متحرک و القا دو قطبی بر سطح آن پلاریزه کرده و نیز باعث ایجاد بارهای مخالف روی سطح ذرات مجاور می شود (شکل ۱-۱)، به این معنا که برهمکنش ها در حداصل مرز بین نانوذره و محلول، موقعیت های رزونانس را متاثر می سازد که به صورت یک تغییر در LSPR (تغییر در جذب/پخش یا خاموشی) و تغییر رنگ محلول نانوذره قابل شناسایی است (۵۰، ۵۴). پیک LSPR از جذب<sup>۳</sup> و پخش<sup>۴</sup> نوری نانوذرات ناشی می شود که در مجموع با عنوان پیک خاموشی<sup>۵</sup> نانوذره شناخته می شود، سهم نسبی هر یک از این دو پدیده نسبت به LSPR کل بسته به شکل و اندازه ی

<sup>1</sup> Localized surface plasmon

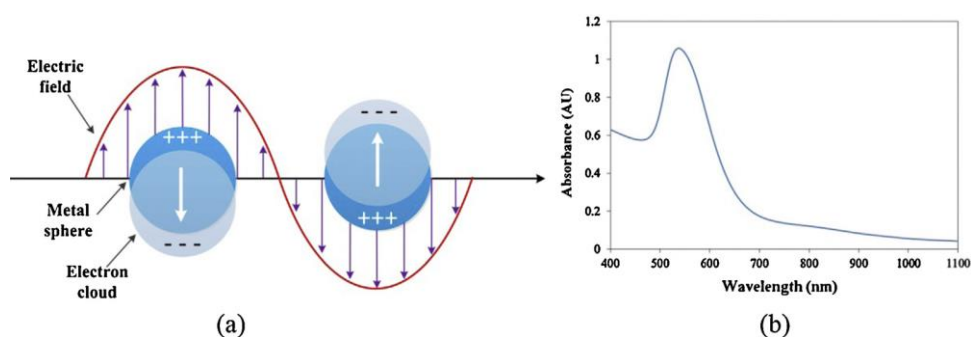
<sup>2</sup> Localized surface plasmon resonance (LSPR)

<sup>3</sup> Absorption

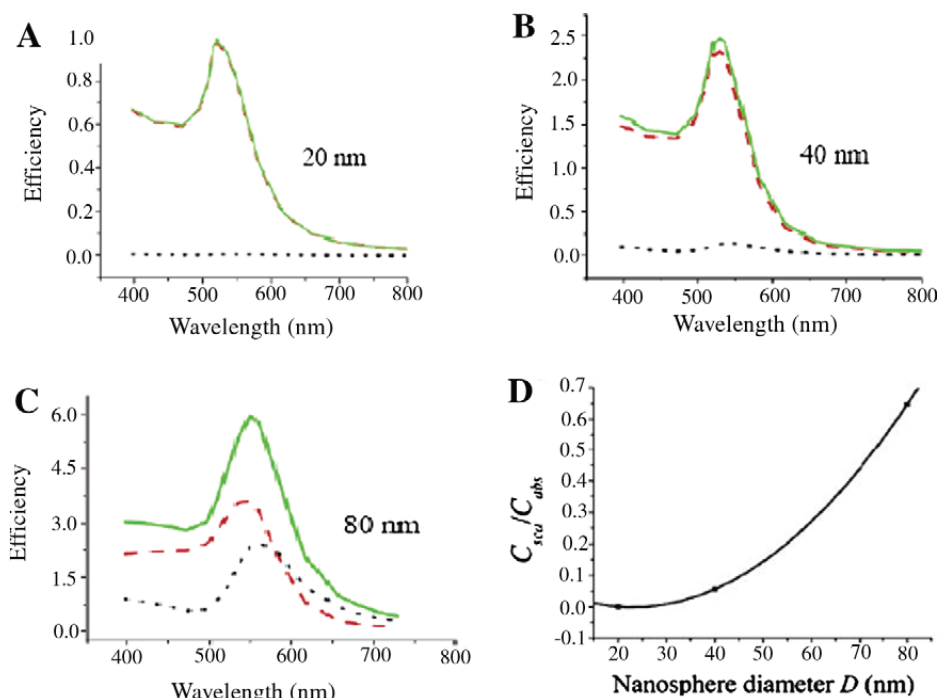
<sup>4</sup> Scatteing

<sup>5</sup> Extinction

نانوذرات می باشد به طوری که ذرات کوچک با اشکال منظم به جزء جذب پیک خاموشی تمایل داشته در حالی که ذرات بزرگتر با اشکال نامنظم سهم بیشتری از پخش را به خود اختصاص می دهند. با افزایش اندازه ی نانو ذرات از ۲۰ تا ۸۰ نانومتر سهم پلاسمون پخش افزایش می یابد. بهره ی نسبی نانوذرات از دو جزء پیک خاموشی، تعیین کننده ی کاربرد آنها در زمینه های مختلف می باشد (شکل ۱-۲) برای مثال نانوذرات بزرگتر در تکنیک های تصویری برداری به کار گرفته می شوند (۵۵، ۵۶).



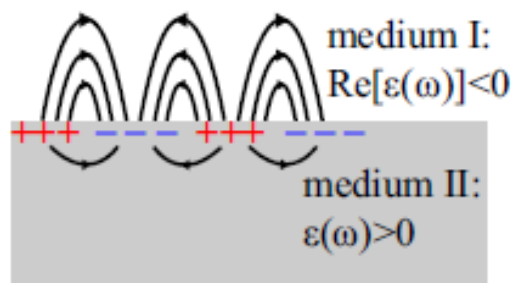
شکل ۱-۱ (a) تصویر شماتیک از برانگیختگی رزونانس پلاسمون سطحی مستقر: (b) باند جذبی معمول نانوذرات طلا کروی (۵۷).



شکل ۱-۲) محاسبه ی بهره وری نسبی نانوذرات کروی طلا از پیک های جذب (منحنی قرمز)، پخش (منحنی آبی) و خاموشی (منحنی سبز) طبق تئوری می در ابعاد (A) ۲۰ نانومتر؛ (B) ۴۰ نانومتر؛ (C) ۸۰ نانومتر (D) وابستگی نسبت سطح مقطع پخش به جذب به اندازه ی نانوذرات کروی طلا (۵۸).

ب) پلاسمون سطحی انتشاری<sup>۱</sup>: این نوع از پلاسمون به برانگیختگی الکترومغناطیسی اطلاق می شود، که در آن میدان الکترومغناطیسی موجود در محیط دی الکتریک با نوسان جمعی الکترون های فلز جفت شده و در امتداد فلز منتشر می شود که با عنوان پلاسمون سطحی قطبیده نیز شناخته می شود (۵۹). حرکت امواج الکترونی در سطح فلز، باعث ایجاد تناوبی از نواحی با بار مثبت و منفی می شود که میدان های الکتریکی ناشی از این نواحی با بار مخالف به طور نمائی از سطح فلز حذف می شوند (۶۰).

<sup>۱</sup> Diffusion Surface Plasmon



شکل ۱-۳) پلاسمون سطحی انتشاری (۶۱).

#### ۱-۱-۴) محاسبات کمی خواص نوری نانوذرات طلا:

تئوری می که در سال ۱۹۰۸ ارائه شد، محاسبه ی کاملی از ویژگی های نوری نانوذرات طلا در اندازه های مختلف به دست می دهد. در این تئوری فرض بر عدم برهمکنش ذرات با یکدیگر و نیز برخورد یک موج صفحه ای به نانوذرات کرومی و یکنواخت طلا گرفته شده است. پاسخ نوری نانوذرات به این موج صفحه ای به صورت ارتعاشات الکتریکی و مغناطیسی بازتاب می شود، که به عنوان سطح مقطع خاموشی ( $C_{ext}$ ) شناخته شده و به صورت مجموعه ی دو پارامتر سطح مقطع جذب ( $C_{abs}$ ) و سطح مقطع پخش ( $C_{sca}$ ) تعریف می شود. برای ذرات کرومی کوچکتر از طول موج نور برخوردی، فقط سطح مقطع جذب در معادله در نظر گرفته شده و سطح مقطع پخش برای آنها قابل چشم پوشی است (۶۲، ۶۳).

معادله ی (۱-۱) نشان دهنده ی تئوری می برای نانوذرات کرومی باشد. در این معادله  $\epsilon_m$ ،  $\epsilon_i$  و  $\epsilon_r$  به ترتیب نشان دهنده ی پارامترهای ثابت دی الکتریک محیط اطراف ذره، ثابت دی الکتریک واقعی و فرضی ذره بوده و  $N$  به تعداد نانوکره های طلا به ازای هر واحد حجم اشاره دارد. طبق معادله زمانی که شرایط  $\epsilon_r = -2\epsilon_m$  فراهم باشد پیک پلاسمون به یک میزان حداکثری (رزونانس) می رسد (۶۲، ۶۴).

<sup>1</sup> Cextinction

<sup>2</sup> Cscattering

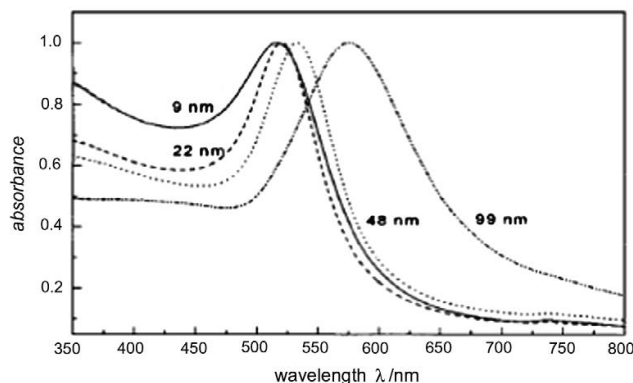
<sup>3</sup> Cabsorbance



معادله (۱-۱) (۵۷).

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 N \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2}$$

به طور معمول موقعیت پیک پلاسمون رزونانس برای نانوذرات کروی طلا در ناحیه ۵۲۰ نانومتر واقع شده است، که با افزایش اندازه و سهم پلاسمون پخش ذرات، این موقعیت تغییر کرده و به صورت کاهش شدت پیک، جابه جایی به سمت قرمز و افزایش پهنای پیک قابل مشاهده می باشد (۶۵)، شکل (۴-۱).



شکل (۴-۱) پیک خاموشی نانوذرات کروی طلا در قطر های مختلف (۵۸).

#### ۱-۱-۵-۴) عوامل موثر بر پیک پلاسمون سطحی:

##### ۱-۱-۵-۴-۱) ثابت دی الکتریک محیط:

یکی از عوامل عمده ی موثر بر خواص پلاسمونی نانوذرات فلزی تغییرات ثابت دی الکتریک محیط می باشد به طوری که افزایش در مقدار آن با افزایش شدت جذب و کاهش نیروی بازیابی مجدد بین با رهای مخالف الکترون های هدایت ، پیک پلاسمون را به سمت طول موج های بالاتر جابه جا می کند که منجر به ایجاد پدیده ی تشدید

در فرکانس پایین تر می شود. در مورد نانوساختارهای کروی زمانی که ضریب دی الکتریک فلز دو برابر ضریب دی الکتریک محیط باشد، تشدید نوسان الکترونی رخ می دهد (۶۶).

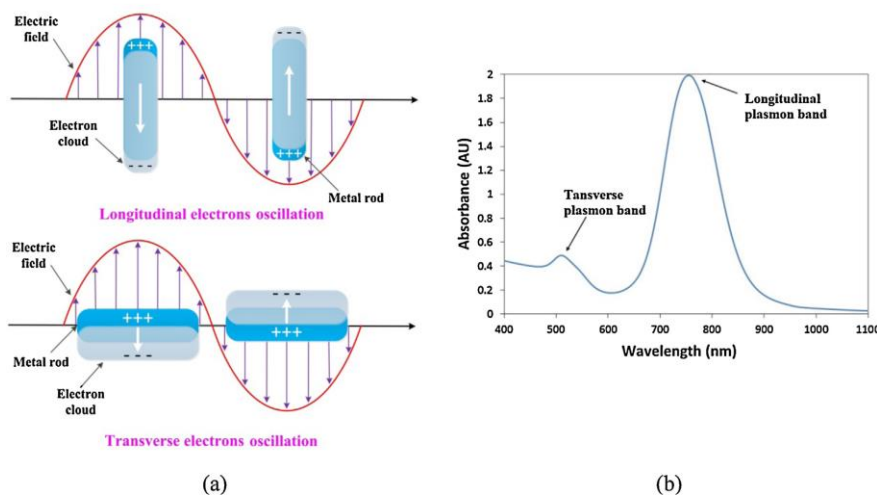
### ۱-۱-۵-۴-۲) شکل و اندازه ی نانوذرات:

نانو ذرات فلزی می توانند در اندازه و اشکال متفاوتی (مانند میله ای، کره ای، ستاره ای و سه گوش) ساخته شوند، که هر یک ویژگی های پلاسمونی متفاوتی نسبت به یکدیگر از خود بروز می دهند. برای نانوذراتی نظیر طلا و نقره از طریق کنترل شکل و اندازه، می توان تقریباً هر رنگ یا باند جذبی را در محدوده ی طیف مرئی تا فروسرخ ایجاد کرد (۶۷) در واقع تغییر شکل هندسی نانوذره با تغییر سطح چگالی میدان الکتریکی بر روی سطح فرکانس ارتعاشی الکترون ها را تغییر داده که منجر به ایجاد برش عرضی متفاوتی برای جذب و پخش می شود. تعداد پیک های نانوذرات بر حسب نحوه ی تقارن آنها متفاوت می باشد به گونه ای که نانوذرات متقارن مانند نانوکره ها تنها یک پیک پلاسمونی داشته (شکل ۱-۱) در صورتی که نانوذرات متقارن نظیر نانومیله ها دارای دو پیک پلاسمونی، شامل یک پیک عرضی مرتبط با نوسان الکترون ها حول محور کوچکتر نانومیله در ۵۳۰ نانومتر و یک پیک پلاسمونی طولی ناشی از ارتعاش الکترون ها حول محور طولی نانومیله ها بوده که در طول موج بالاتری شکل می گیرد و به صورت شماتیک در (شکل ۱-۵) مشخص شده است (۶۸). تغییر اندازه ی نانوذرات نیز بر پیک پلاسمون آنها تاثیر می گذارد به طوری که با افزایش اندازه پیک پهن تر شده و به سمت طول موج های بالاتر، فروسرخ<sup>۱</sup> (به سمت قرمز<sup>۲</sup>) جابه جا می شود (شکل ۱-۴). به طور کلی می توان گفت که تغییرات پیک پلاسمون ناشی از تاثیر عواملی نظیر اثر عقب ماندگی مغناطیسی، کاهش نیروی بازتابی مجدد بین بارهای مخالف (هسته ی

<sup>۱</sup> Infra-red

<sup>۲</sup> Red shift

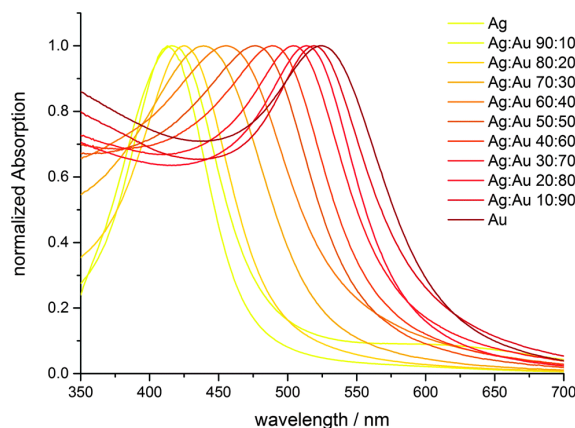
اتم و الکترون های هدایتی ( اثر میرایی و تهییج پلاسمایی چندگانه (در اثر پلاریزاسیون ناهمسان در سطح نانوذرات) می باشد (۶۹, ۷۰).



شکل ۱-۵ (a) نمایی از پدیده ی برانگیختگی رزونانس پلاسمون سطحی مستقر برای نانوذرات میله ای طلا (b) پیک های پلاسمونی طولی و عرضی مسئول نوسان الکترون ها حول محور بلند و محور کوتاه نانوذرات میله ای (۵۷).

### ۱-۱-۵-۴-۳) ترکیب نانوذرات :

عامل دیگری که شکل و موقعیت پیک پلاسمونی از آن تاثیر می پذیرد ترکیب نانوذرات میباشد. برای مثال نانوذرات طلا و نقره هر کدام به ترتیب یک پیک جذبی را در موقعیت های ۵۱۶ نانومتر و ۴۱۵ نانومتر به خود اختصاص می دهند، در حالی که نانوساختارهایی که یک ترکیب آلیاژی از این دو فلز را دارا می باشند یک موقعیت در بین این دو پیک را اتخاذ میکنند. افزایش نسبت طلا در آلیاژ پیک را به سمت طول موج های بالاتر جابه جا می کند (۷۱) (شکل ۱-۶).



شکل ۱-۶) طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوالیازهای طلا و نقره با نسبت های ترکیبی متفاوت از هر کدام، رنگ هر منحنی مربوط به پراکندگی ذرات مربوطه می باشد (۷۱).

#### ۱-۵-۵) ویژگی ها و کاربردهای نانوذرات طلا:

نانو ذرات طلا، ذرات فلزی نوبل بوده که ویژگی ها و عملکردهای جدید و منحصر به فردی را که به طور چشمگیری متفاوت از خصوصیات آنها در حالت توده می باشد بروز می دهند . این ویژگی ها مرتبط با هندسه و اندازه ی ذرات می باشند به گونه ای که طلا در حالت توده دارای رنگ زرد بوده ولی با کاهش اندازه ی آن در ابعاد یک فیلم نازک فلزی و نانو ذرات به ترتیب رنگ های آبی، نارنجی، بنفش و قرمز به خود می گیرند. علاوه بر آن پایداری بالا و نیز ویژگی های مغناطیسی، الکتریکی، نوری به ویژه باند جذبی قوی در ناحیه ی مرئی طیف الکترومغناطیس ناشی از رزونانس پلاسمون سطحی آنها که از نوسان جمعی الکترون های هدایت فلز در برخورد با نور سرچشمه می گیرد، زمینه ی کاربردهای متنوع و فراوانی را برای نانوذرات طلا فراهم کرده است (۷۲، ۷۳) که از جمله می توان به کاربرد آنها در زمینه ی عکسبرداری، دارورسانی، صنایع غذایی، نانوالکترونیک، دامپزشکی، افزایش پاسخ های طیف سنجی و حسگرهای شیمیایی و بیولوژیکی اشاره کرد (۷۴). در این بخش به دلیل استفاده از نانوذرات طلا به منظور اهداف تشخیصی در این تحقیق به چند مورد از انواع حسگرها اشاره خواهد شد.

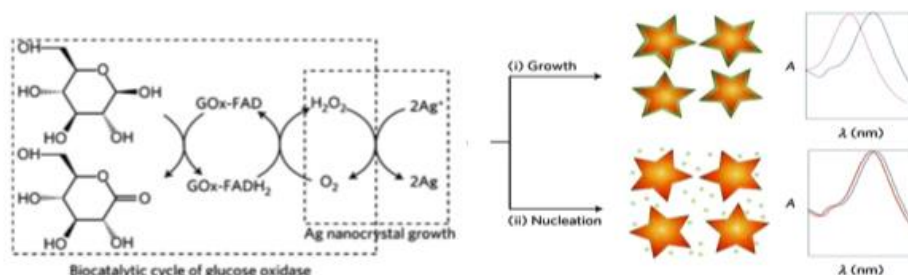
#### ۱-۵-۵-۱) روش های سنجش مواد بر پایه ی تشکیل نانوذرات فلزی:

این روش ها عمدتاً بر پایه ی به کارگیری آنالیت مورد نظر به عنوان عامل احیاء کننده ی نمک فلزی در سنتز نانوذرات می باشد که می توانند نقش احیاء کنندگی خود را به صورت مستقیم یا غیرمستقیم ایفا کنند. سنتز نانوذرات با تشکیل یک پیک پلاسمونی همراه می شود که با توجه به ارتباط مستقیم بین غلظت عامل احیاء کننده (آنالیت) و شدت پیک، می توان غلظت آنالیت مورد نظر را اندازه گیری کرد (۷۵). برای مثال در یک ارزیابی ایمنی مبتنی بر آنزیم (الیزا) از این روش برای شناسایی آنتی ژن اختصاصی پروستات<sup>۱</sup> (PSA) استفاده شد که در آن از آنزیم گلوکزاکسیداز<sup>۲</sup> (GOx) به عنوان لیبل متصل به آنتی بادی اختصاصی PSA، برای کنترل رشد نانوذرات نقره در حضور نانوستاره های طلا (به عنوان حسگرهای پلاسمونی در فرآیند احیاء نانوذرات نقره) استفاده شده است. در این فرآیند هیدروژن پراکسید (محصول آنزیم GOx) با احیاء یون های نقره منجر به شکل گیری نانوذرات نقره شده و یا باعث رشد پوششی یون های نقره در اطراف نانوستاره های طلا می شود. از آنجایی که غلظت گلوکز اکسیداز مستقیماً با غلظت آنالیت مرتبط است، در غلظت های پایین از آنالیت و متعاقباً GOx با رسوب مقدار بیشتری از یون های نقره بر روی نانوستاره ها یک تغییر بزرگی در پیک پلاسمون نانوذرات به سمت آبی مشاهده می شد، در صورتی که در غلظت بالاتر آنالیت و عامل احیایی تمایل بیشتر به سمت سنتز نانوذرات نقره بوده که منجر به تغییرات بسیار کوچکی در پیک پلاسمون شده که تاییدی بر فراوانی بالای آنالیت می باشد (۷۶) (شکل ۱-۷).

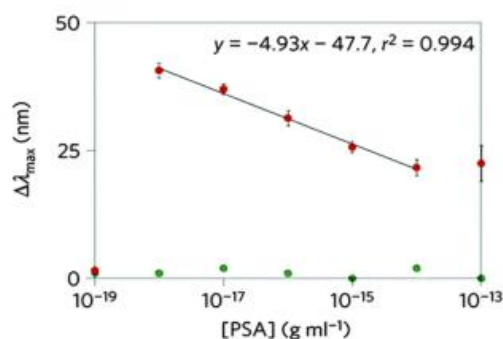
<sup>۱</sup> Prostate-specific antigen (PSA)

<sup>۲</sup> Glucose oxidase (GOx)

**A**



**B**



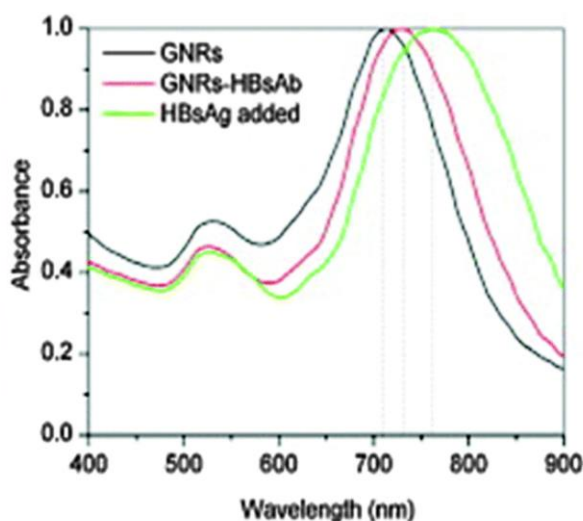
شکل ۷-۱ (A) هسته سازی یا رسوب کنترل شده ی یون های نقره توسط آنزیم گلوکز اکسیداز: (B) نمودار نشان دهنده ی ارتباط تغییرات طیف جذبی با تغییر غلظت آنالیت (۷۶).

#### ۲-۵-۵-۱-۱ حسگرهای شیمیایی بر اساس تغییرات ضریب شکست محیط:

گروه دیگری از حسگرها هستند که از حساسیت پیک پلاسمون نانوذرات فلزی نسبت به تغییرات ثابت دی الکتریک و نیز ضریب شکست<sup>۱</sup> محیط اطراف آنها جهت سنجش آنالیت ها استفاده می کنند. در صورتی که نانوذرات دارای واکنشگر محافظت کننده ای باشند که نسبت به آنالیت مورد نظر تمایل جذبی داشته باشد، این واکنش جذبی منجر به تغییر ضریب شکست محیط شده که به صورت جابه به جایی پیک پلاسمون نانوذرات نمود پیدا می کند به طوری که افزایش ضریب شکست محیط پیک پلاسمون را به سمت طول موج های بالاتر طیف نور مرئی جابه جا می کند. جابه جایی پیک با غلظت آنالیت ارتباط داشته که برای اندازه گیری آن مورد

<sup>۱</sup> Refractive index

استفاده قرار می گیرد (۷۷). یک مثال از کاربرد این روش شناسایی آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت ب<sup>۱</sup> (HBsAg) با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال می باشد که به وسیله ی جذب فیزیکی به سطح نانومیله های طلا متصل شده بودند. همانطور که در شکل نشان داده شده افزودن آنالیت، با تغییر ضریب شکست محیط منجر به تغییر پیک پلاسمون به سمت قرمز طیف الکترومغناطیس شده است (۵۰، ۷۸) (شکل ۸-۱).



شکل ۸-۱) تاثیر تغییر ضریب شکست ناشی از افزودن آنالیت بر روی طیف جذبی نانومیله های استفاده شده برای شناسایی آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت ب (۶۹).

#### ۱-۱-۵-۳ حسگرهای شیمیایی بر اساس تجمع نانوذرات فلزی:

ویژگی های نوری نانوذرات پلاسمونی طلا به شدت به فاصله ی بین ذرات وابسته است در نانوذرات برهنه و تجمع یافته این ویژگی ها نسبت به هم متفاوت هستند که از این تفاوت به منظور اهداف تشخیصی بهره گرفته شده است. نانوذرات طلا دارای یک باند جذبی قوی در ناحیه ی مرئی طیف الکترومغناطیس می باشند. زمانی که

<sup>۱</sup> Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)

در اثر مجاورت نزدیک یا فاصله ی کمتر از دو برابر قطر نانوذره یک جفت سازی پلاسمونی بین ذره ای شکل می گیرد منجر به آشفته گی در باند جذبی LSPR ذرات تجمع یافته و یک جابه جایی در پیک به سمت قرمز می شود. نانوذرات طلا دارای تمایل اتصال بالایی نسبت به گروه های تیولی (SH-) می باشند از این رو در حضور آنالیت های حاوی گروه تیولی نظیر سیستئین، بعد از اتصال عامل تیولی به سطح نانوذرات طلا اتصالات بین گروه های آمینی و کربوکسیلی بین نانوذرات طلا به عنوان رابط عمل کرده و سبب تجمع ذرات می شوند (۷۹). میدان های موازی موضعی ناشی از توزیع نامتقارن ابر الکترونی در اثر جفت شدگی پلاسمون میان ذرات تجمع یافته منجر به افزایش قطبش پذیری نانوذرات شده که مسئول کاهش پیک اولیه ی نانوذرات طلا و تشکیل پیک جدید در طول موج های بلندتر می شود شایان ذکر است که این مورد در خصوص تجمعات ناشی از میانکنش های بین ذره ای قوی صدق می کند، در میانکنش های بین ذره ای متوسط تنها جابه جایی پیک به سمت طول موج های بلندتر و پهن شدگی آن مشاهده می شود. توانایی مرتبط کردن حالت تجمعی نانوذرات پلاسمونی به حضور یا غیاب مولکول زیستی هدف منجر به ایجاد ارزیابی های مختلف مبتنی بر رنگ سنجی شده است که در این میان می توان به شناسایی آنالیت هایی مانند قندها، یون ها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و غیره با استفاده از نانوذرات طلا اشاره کرد (۸۰).

عوامل متعددی به ویژه غلظت نمک به عنوان عامل القائی، قدرت یونی، دما و pH محیط، شدت و سرعت تجمع نانوذرات را تحت تاثیر قرار می دهند. به منظور تفهیم بهتر چگونگی تاثیر هریک از این عوامل ابتدا به بررسی ویژگی های محلول کلوئیدی طلا می پردازیم.



احیاء نمک طلا توسط سیترات در محیط آبی رایج ترین روش شیمیایی مرطوب<sup>۱</sup> برای سنتز نانوذرات طلا با ابعاد ۱۰ تا ۱۵۰ نانومتر می باشد از آنجایی که این روش برای اولین بار توسط ترکویچ<sup>۲</sup> ارائه شد، با عنوان روش ترکویچ<sup>۲</sup> نیز شناخته می شود. محلول کلئیدی نانوذرات طلا سنتز شده با این روش به دلیل بار منفی سیترات که طی سنتز سطح نانوذرات را پوشانده و منجر به ایجاد نیروی دافعه ی الکترواستاتیک بین آنها می شود می تواند برای مدت طولانی پایدار بماند. در واقع فرآیند جذب سطحی، یون ها را بر روی نانوذرات حفظ می کند (۸۱). لایه ی مضاعف الکتریکی<sup>۳</sup> (EDL) که متشکل از اثر هم افزایی لایه ی جذب سطحی اولیه<sup>۴</sup> ناشی از بار منفی سیترات جذب شده بر سطح نانوذرات و لایه ای از بار مثبت محلول احاطه کننده ی نانوذرات باردار با عنوان لایه ی یون مخالف<sup>۵</sup> می باشد، با ممانعت از تجمع نانوذرات باعث پایداری محلول کلئیدی آنها می شود. بار موثر نانوذرات از نزدیک شدن آنها به یکدیگر در فاصله ی کمتر از  $2d_1$  (فاصله ای که در آن نانوذرات مجتمع می شوند) ممانعت می کند این بار به دلیل وجود تعداد مساوی از یون ها در دو لایه ی احاطه کننده نانوذرات در نقاط  $d_1$  و  $d_2$  نزدیک صفر می باشد. محلول کلئیدی نانوذرات طلا به دلیل اندازه ی بسیار کوچک ذرات از پایداری طولانی مدتی برخوردار می باشند ولی در صورت وجود یون های مخالف اضافه در اطراف نانوذرات، با کاهش بار موثر تعادل بارها به هم زده می شود به طوری که حضور الکتروولیت ها با فشرده کردن لایه ی یون مخالف و در نتیجه غلبه ی نیروی جاذبه ی واندروالس به دافعه ی الکترواستاتیک باعث تجمع نانوذرات در فاصله ی کم تر از  $2d_1$  می شود. فرآیند تجمع نانوذرات کلئیدی منفرد و تشکیل محلول لخته شده را لخته شدن<sup>۶</sup> نامیده می شود (۸۲، ۸۳).

<sup>1</sup> Wet Chemical Methods

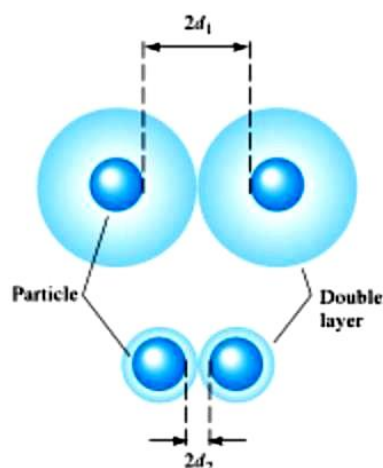
<sup>2</sup> Turkevich 's method

<sup>3</sup> Electric double layer (EDL)

<sup>4</sup> Primary adsorption layer

<sup>5</sup> Counter ion layer

<sup>6</sup> Coagulation



شکل ۱-۹) لایه ی مضاعف الکتریکی محلول کلئیدی طلا در برگرنده ی لایه ی جذب سطحی اولیه و لایه ی یون مخالف (۸۳).

#### ۱-۱-۵-۶) عوامل موثر بر میزان تجمع نانوذرات:

##### ۱-۱-۵-۶-۱) اثر پتانسیل زتا:

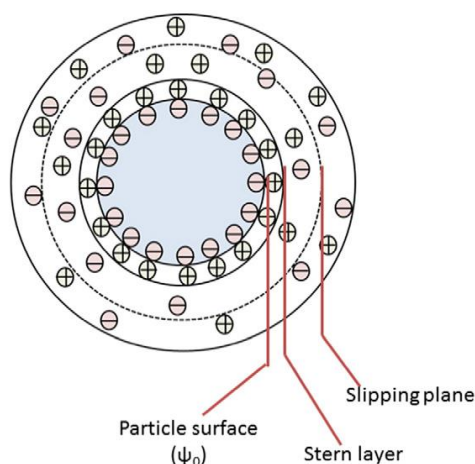
طبق نظریه ی DLVO<sup>۱</sup> پایداری نانوذرات کلئیدی به مجموعه ی نیروهای جاذبه ی واندروالس و نیروهای دافعه ی الکترو استاتیک ناشی از EDL وابسته می باشد. برقراری توازن میان این دو نیروی مخالف مانع از تجمع نانوذرات می شود در حالی که با به هم خوردن این توازن با غالبیت نیروی جاذبه ی واندروالس، ذرات به هم نزدیک شده و مجتمع می شوند. زمانی که ذرات باردار در محلول پراکنده می شوند، یک لایه ی مضاعف الکتریکی ناشی از جذب آنیون ها و کاتیون ها در سطح آنها ایجاد می شود (۸۴) همانطور که در شکل ۱-۱۰ نشان داده شده است لایه ی داخلی<sup>۲</sup> (لایه ی استرن) آن دارای بار مخالف با بار ذره بوده و اتصال محکم تری با آن داشته در حالی که لایه ی انتشار خارجی<sup>۳</sup> ناشی از میدان الکترو استاتیکی ذرات باردار با اتصال ضعیف تر، متشکل از دو زیر لایه با هر دو بارهای مخالف و مشابه در هر زیر لایه، فراتر از لایه ی استرن رشد کرده و به همراه آن لایه

<sup>۱</sup> Derjaguin, Landau, Verway and Overbeek (DLVO) theory

<sup>۲</sup> Inner layer (Stern layer)

<sup>۳</sup> Outer diffuse layer

ی EDL را تشکیل می دهند. ترکیب لایه ی انتشار پویا بوده و بسته به فاکتور های مختلفی نظیر pH، قدرت یونی و غلظت متغیر می باشد، در این لایه یک سطح فرضی به عنوان مرز بین ذرات متحرک و لایه ی پراکنده ی اطراف آن عمل کرده و سطح لغزشی<sup>۱</sup> نامیده می شود. پتانسیل مرز بین ذره و مایع اطراف آن با عنوان پتانسیل زتا<sup>۲</sup> شناخته می شود که مبنای سنجش نیروی الکترواستاتیک بین نانوذرات قرار می گیرد (۸۵).



شکل ۱-۱۰) لایه های موجود بر روی نانوذره و محتوای باری هریک از آنها (۸۵).

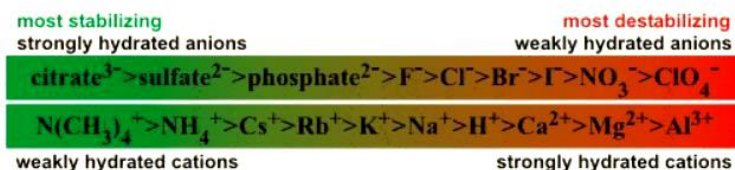
#### ۱-۱-۵-۶-۲) اثر الکترولیت ها:

عملکرد الکترولیت ها در القای تجمع نانوذرات عمدتاً با تاثیر بر لایه ی مضاعف الکتریکی احاطه کننده ی آنها بوده که طی فرآیند Salting out یا خارج سازی آب از سطح نانوذرات و فشردن لایه ی مضاعف الکتریکی

<sup>۱</sup> Slipping plane

<sup>۲</sup> Zeta potential

باعث تجمع ذرات می شوند (۸۶). هافمیستر<sup>۱</sup> یون ها را بر اساس قدرت آب پوشی آنها به دو گروه الکترولیت هایی با قدرت آب پوشی بالا<sup>۲</sup> و قدرت آب پوشی پایین<sup>۳</sup> تقسیم بندی کرده است. (شکل ۱-۱۱) مکانیسم عملکرد الکترولیت ها مبنی بر توانایی بالای آنها در خارج سازی حجم زیاد آب از سطح نانوذرات می باشد که باعث کاهش قدرت برقراری پیوند های هیدروژنی در سطح نانوذرات ، ناپایداری و در نهایت تجمع آنها می شود (۸۷).



شکل ۱-۱۱) ترتیب هافمیستر نشان دهنده ی قدرت آبپوشی یونها (۸۸).

#### ۱-۱-۵-۶-۳) اثر دما:

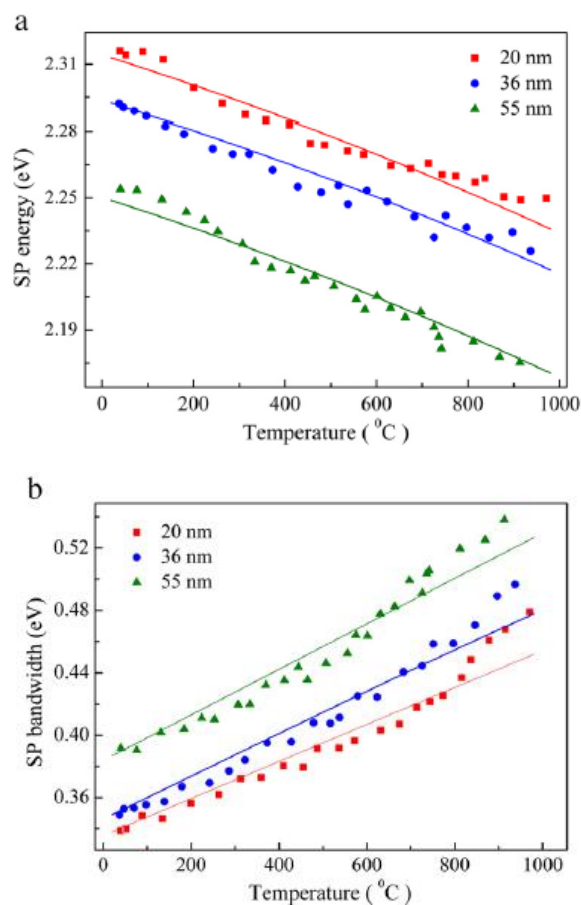
دما یک فاکتور محیطی مهم بوده که می تواند سینتیک تجمع نانوذرات را از طریق تاثیر گذاری بر حرکت براونی تصادفی ذرات تغییر دهد. در واقع دمای بالا انرژی سینتیکی لازم برای غلبه بر نیروی دافعه ی لایه ی مضاعف یونی را با ارتقاء فرکانس برخورد بین ذرات فراهم کرده و نیز دپروتونه شدن سطح ذرات ناشی از افزایش دما باعث می شود که پتانسیل زتا به میزان کمتری مثبت شده و با کاهش نیروی دافعه ی الکترواستاتیک یا سد انرژی بین نانوذرات منجر به تجمع سریع آنها می شود (۸۹). (شکل ۱-۱۲) تاثیر افزایش دما بر روی پهنای پیک پلاسمون و نیز انرژی پلاسمون سطحی را برای نانوذرات در اندازه های مختلف نشان می دهد به طوری که افزایش دما با

<sup>1</sup> Hofmeister

<sup>2</sup> Strongly hydrated ions (Kosmotropic)

<sup>3</sup> Weakly hydrated ions (Chatropic)

تجمع و افزایش اندازه ی نانوذرات منجر به کاهش انرژی پلاسمون ، افزایش پهنای پیک پلاسمون و تغییر آن به سمت ناحیه ی قرمزطیف الکترومغناطیس شده است (۹۰).



شکل ۱۲-۱) تاثیر دما بر روی (a) انرژی پلاسمون سطحی و (b) پهنای پیک پلاسمون نانوذرات طلا در اندازه های مختلف (۹۰).

#### ۱-۱-۵-۶-۴) اثر اندازه و شکل نانوذرات:

طبق نظریه ی DELVO با کاهش اندازه ی ذره سد انرژی های برهم کنشی نیز کاهش می یابد. تقلیل در اندازه ی ذره منجر به ظهور نسبت بالایی از اتم ها روی سطح ذره شده که با تغییر ساختار الکترونی بار سطحی واکنش پذیری سطح نانوذره را متعاقب افزایش نواحی فعال افزایش می دهد. از آنجا که تجمع باعث کاهش

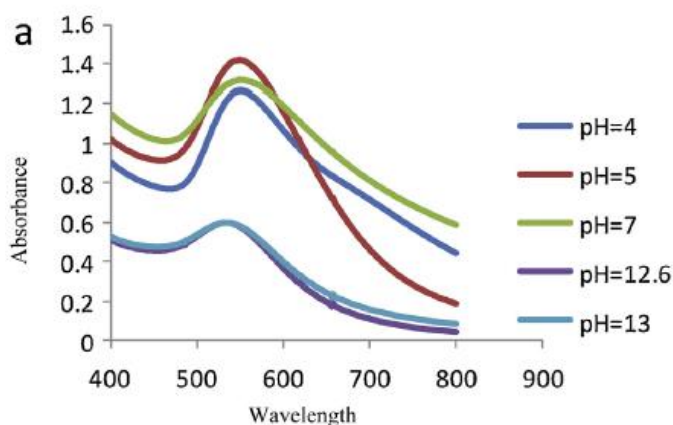
انرژی آزاد در سیستم نانوذره می‌شود ذرات کوچکتر با انرژی سطحی بالا، با سرعت بیشتری نسبت به ذرات بزرگتر مجتمع می‌شوند (۹۱، ۹۲).

علاوه بر آن نانوذرات می‌توانند دارای اشکال مختلفی باشند که رفتار متفاوتی از آنچه که طبق نظریه‌ی DELVO برای تجمع نانوذرات کروی ارائه شده است نشان می‌دهند. هر دو نیروی واندروالس و EDL با تغییر شکل ذرات تحت تاثیر قرار می‌گیرند. به طور فرضی نیروهای EDL با جهت‌گیری‌های تعاملی مرتبط هستند که این امر منجر به ایجاد آرایه‌های اتمی مختلف در سطح این ذرات می‌شود. برای مثال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با سه فاز کریستالی شامل rutile, anatase و brookite دارای بر سحی متفاوتی می‌باشند که می‌تواند سرعت رسوب و تجمع ذرات را تحت تاثیر قرار دهد. دلیل این امر توانایی تعامل سطوح کریستالوگرافی مختلف حاوی چگالی‌های اتمی متفاوت با فاز آبی جهت ایجاد گستره‌های وسیعی از EDL و انرژی سطحی می‌باشد (۹۱).

#### ۱-۱-۵-۶-۵-۱-۵ تاثیر pH :

از جمله عوامل مرتبط با ویژگی‌های شیمیایی محلول موثر بر تجمع نانوذرات pH و قدرت یونی محلول می‌باشند. این دو فاکتور به دلیل اثر تعیین کنندگی زیادی که بر روی بار و چگالی سطحی ذرات دارند پایداری آنها را در محیط آبی به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهند. حضور گروه‌های هیدروکسی و کربوکسی در ساختار سیترات پوشاننده‌ی سطح نانوذرات طلا منشا عمده‌ی تغییرات pH می‌باشد. pH محلول کلوئیدی نانوذرات طلا ساخته شده برابر با ۶ می‌باشد از این رو نانوذرات طلا در pH ۴/۵ تا ۱۰ پایدار می‌باشند ولی در خارج از این بازه به دلیل پروتون دار شدن سیترات در محیط اسیدی و یا تغییرات قابل توجه قدرت یونی در pH بالای ۱۰ تجمع

نانوذرات رخ داده که به صورت تغییر در پیک پلاسمون قابل مشاهده می باشد که در شکل ۱-۱۳ نشان داده شده است (۹۱، ۹۳).



شکل ۱-۱۳ اثر تغییرات pH بر روی پیک پلاسمون نانوذرات طلا (۹۴).

#### ۱-۱-۵-۶-۱ انواع رفتارهای تجمعی نانوذرات فلزی در محیط آبی:

الف) تجمع برگشت پذیر<sup>۱</sup>: این حالت که فلوکوله شدن<sup>۲</sup> نیز نامیده می شود، ناشی از نیروهای فیزیکی است که باعث برخورد بین ذرات و تجمع آنها می شوند (۹۵).

ب) تجمع برگشت ناپذیر<sup>۳</sup>: در این شکل از تجمع نانوذرات در اثر تجمع سریع، طی فرآیندی که لخته شدن یا انباشتگی<sup>۴</sup> نامیده می شود مجتمع های ذره ای برگشت ناپذیری تشکیل می شوند که می تواند بر اساس راندمان برخورد<sup>۵</sup> (a) بین ذرات به دو حالت تجمع خوشه ای محدود به واکنش<sup>۶</sup> (RLCA) و تجمع خوشه ای محدود به

<sup>1</sup> Reversible aggregation

<sup>2</sup> Flocculation

<sup>3</sup> Irreversible aggregation

<sup>4</sup> Coagulation

<sup>5</sup> Collision efficiency

<sup>6</sup> Reaction-limited cluster aggregation (RLCA)

انتشار<sup>۱</sup> (DLCA) صورت پذیرد که به طور اساسی از لحاظ کینتیک و ساختارهای تجمعی با یکدیگر متفاوت می باشند (۹۶). حالت اول مربوط به زمانی است که مقدار  $\alpha$  کمتر از یک بوده و افزودن الکترولیت ها با تغییر بار سطحی و کاهش سدهای انرژی بین ذرات، در غلظتی از الکترولیت که غلظت انباشتگی بحرانی<sup>۲</sup> (CCC) نامیده می شود منجر به تجمع ذرات می شود. شیوه ی تجمعی دوم زمانی رخ می دهد که  $\alpha$  نزدیک به یک بوده و نیز الکترولیت ها در مقدار غلظتی بالای CCC با حذف سد های انرژی دافعه ای باعث تجمع سریع ذرات می شود (۹۷).

#### ۱-۱-۵-۶-۷ روشهای تشخیصی بر اساس تجمع نانوذرات فلزی:

اولین حسگر DNA که از ویژگی های تجمعی تعدیل یافته با پلی نوکلئوتیدها جهت تشخیص رنگ سنجی بهره گرفته بود، در سال ۱۹۹۷ توسط Mirkin و همکارانش معرفی شد (۹۸). در طول دهه های اخیر تا به امروز انواعی از حسگرها با اساس حسگر اولیه ی Mirkin جهت تشخیص آنالیت ها یی نظیر سلول ها، پروتئین ها، نوکلئیک اسیدها، ساختارها و مولکول های کوچک مانند یون های فلزی توسعه یافته اند. تجمع نانوذرات در این حسگرها با دومکانیسم، تجمع توسط یک رابط مولکولی بین نانوذرات (مانند گروه های تیولی) و تجمع از طریق ناپایدار کردن نانوذرات توسط عوامل القایی خارجی نظیر الکترولیت ها انجام می پذیرد.

#### ۱-۱-۵-۶-۷-۱ ناپایدار کردن نانوذرات فلزی توسط الکترولیت ها:

ناپایدار کردن نانوذرات فلزی توسط الکترولیت ها از طریق سه مکانیسم زیر صورت می پذیرد:

<sup>۱</sup> Diffusion-limited cluster aggregation (DLCA)

<sup>۲</sup> Critical coagulation concentrations (CCC)



الف) ناپایدار کردن نانو ذرات با کاهش نیروی دافعه الکترواستاتیک<sup>۱</sup> بین نانو ذرات از طریق کاستن یا تغییر بار الکتریکی سطحی نانو ذرات (۹۹، ۱۰۰)

ب) ناپایدار کردن نانو ذرات با کاهش نیروی دافعه الکترواستریک<sup>۲</sup> بین نانو ذرات از طریق تغییر ساختار فضایی پلیمر باردار در سطح نانو ذرات (۹۹).

ج) ناپایدار کردن نانوذرات با کاهش نیروی دافعه الکترو استاتیک بین نانو ذرات از طریق حذف یا تغییر ساختار پلیمر باردار در سطح نانو ذرات (۱۰۱).

#### ۱-۵-۶-۷-۲) روش های مبتنی بر تجمع نانوذرات جهت تشخیص اسیدنوکلیک ها (DNA and RNA):

این روش ها به دو نوع شبکه ای<sup>۳</sup> (CL) و غیر شبکه ای<sup>۴</sup> (NCL) تقسیم می شوند (شکل ۱-۱۴).

الف) روش شبکه ای (CL): این روش رایج ترین روشی است که تا دهه های اخیر جهت تشخیص اسید نوکلئیک به کار گرفته شده است. در این روش از دو نانوپروب اسید نوکلئیکی<sup>۵</sup> (DNA-Np) که هر کدام مکمل قسمتی از ژن هدف می باشد استفاده می شود. این نانوپروب ها در حضور ژن هدف با آن هیبرید شده و با نزدیک شدن به یکدیگر یک شبکه ای پلیمری از نانوذره و اسید نوکلئیک تشکیل داده و منجر به تغییر رنگ محلول (قرمز به آبی ارغوانی) می شوند (۱۰۲).

ب) روش غیرشبکه ای (NCL): در این روش از یک (DNA-Np) که به تنهایی مکمل کل توالی ژنی مورد تشخیص می باشد استفاده می شود. همچنین این روش جهت تجمع نانوذرات از القای نمکی استفاده می کند.

<sup>1</sup> Loss of electrostatic stabilization

<sup>2</sup> Loss of (electro)steric stabilization

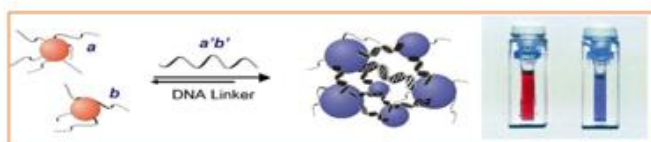
<sup>3</sup> Cross-Linking (CL)

<sup>4</sup> Non Cross-Linking (NCL)

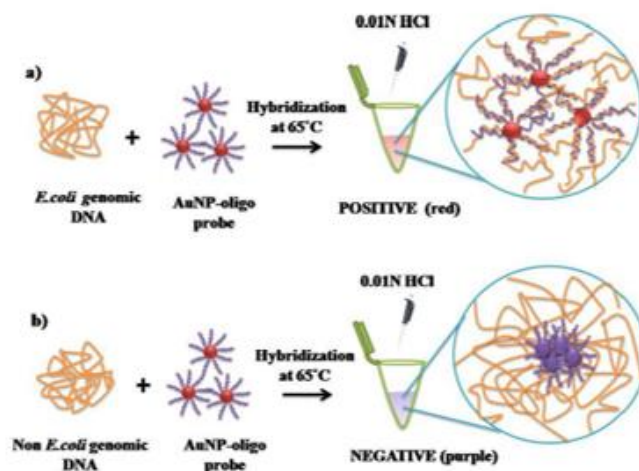
<sup>5</sup> DNA-Nanoparticle (DNA-Np)

این نانوپروب در صورت حضور توالی هدف مکمل خود در نمونه با آن هیبرید شده و با ممانعت فضایی مضاعفی که ایجاد می کند حتی در غلظت های بالای عامل القایی نیز مانع تجمع و تغییر رنگ نانودرات می شود (۱۰۳).

A



B



شکل ۱-۱۴) روش های تشخیصی مبتنی بر تجمع نانوذرات طلا جهت تشخیص اسید نوکلئیک ها (A). روش شبکه ای (B) روش غیر شبکه ای (a) عدم تجمع نانوپروب در حضور توالی هدف پس از افزودن الکترولیت (b) تجمع نانوپروب ها در حضور توالی غیر هدف پس از القای نمکی (۱۰۴, ۱۰۵).

## فصل دوم

### بررسی متون

## فصل-۲) بررسی متون<sup>۱</sup>

در این فصل به بررسی نمونه هایی از مطالعات صورت گرفته جهت تشخیص بیماری هایی نظیر سرطان، بیماری های ژنتیکی و نیز پاتوژن های باکتریایی و ویروسی که در آنها از نانوذرات طلا به عنوان ابزار تشخیصی بهره گرفته شده است خواهیم پرداخت.

۱. در سال ۱۹۹۷ Mirkin و همکارانش از دانشگاه نورث وسترن آمریکا با به کار گیری نانوذرات طلا اولین حسگر تشخیصی DNA، مبتنی بر حالت شبکه ای شدن (CL) را ابداع کردند که دو نانوپروب (DNA-Nanoprobe) الیگونوکلئوتیدی مکمل DNA تک رشته ای، در صورت حضور توالی هدف با آن هیبرید شده وبا تشکیل شبکه ی پلیمری از DNA و نانوذرات طلا رنگ محلول از قرمز به آبی -ارغوانی تغییر می کرد. آنها در روش خود از ۳ و ۵ آلکیل الیگونوکلئوتید برای تیمار نانوذرات استفاده کرده بودند (۹۸).

۲. در سال ۲۰۰۳ Sato و همکارانش در موسسه تحقیقات شیمی فیزیک سایتاما ژاپن، با استفاده از نانوذرات طلا ۱۵ نانومتری متصل به پروب الیگونوکلئوتیدی در یک رویکرد غیر شبکه ای (NCL) اقدام به شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی نمودند. نتایج آزمایشات آنها حاکی از توانایی این روش جهت شناسایی DNA هدف تک رشته ای با تفاوت یک باز در توالی، از طریق فراهم کردن نیروی دافعه بود. در این تحقیق در صورت حضور DNA هدف، در غلظت بالای 0.5 M نمک سدیم کلراید، تجمع نانوذرات و تغییر رنگ از قرمز به آبی-ارغوانی مشاهده می شد. همچنین یافته های آنها نشان دهنده ی

---

<sup>۱</sup> Literature review

لزوم حضور مقادیر زیادی از DNA هدف در حالت NCL نسبت به CL، جهت تجمع نانوذرات بود (۱۰۱).

۳. در سال ۲۰۰۴ Rothberg و همکارش در دانشگاه روشستر امریکا با استفاده از روش NCL اقدام به شناسایی DNA تک رشته ای سنتتیک نمودند. آنها در آزمایش خود از نیروی جاذبه الکترواستاتیک بین پروب هیبرید نشده به نانوذرات طلا بهره گرفته بودند به طوری که در حضور توالی هدف تک رشته ای، پروب مکمل با آن هیبرید و نانوذرات منفرد با اثر القائی نمک مجتمع شده و تغییر رنگ مشاهده می شد، در حالی که در صورت عدم حضور رشته ی هدف، جاذبه ی الکترواستاتیک بین نانوذرات و پروب الیگونوکلوئیدی مانع تجمع (حتی با اثر القائی نمک) نانوذرات می شد (۱۰۶، ۱۰۷).

۴. در سال ۲۰۰۵ Sato و همکارانش در موسسه ی شیمی فیزیک سایتاما ژاپن با استفاده از روش NCL اقدام به شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در DNA ژنومیک سلول های سرطانی نمودند. آنها در آزمایش خود از روش گسترش پرایمر<sup>۱</sup> جهت شناسایی اختلاف تک نوکلئوتیدی در دورترین فاصله از نانوذرات طلا بهره گرفتند. روش آنها علاوه بر مطابقت نتایج با روش های استاندارد، از مزیت سهولت و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده نیز برخوردار بود (۱۰۸).

۵. در سال ۲۰۰۶ Baptista و همکارانش در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی لیسبون پرتغال با بهره گیری از روش NCL و خاصیت القاگری نمک سدیم کلراید اقدام به شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نمودند (۱۰۹).

۶. در سال ۲۰۰۷ Franco و همکارانش در پرتغال با روش مبتنی بر NCL و یک نانوپروب منفرد دو موتاسیون رایج تالاسمی، از نوع SNP را شناسایی نمودند. در آزمایش آنها با هیبریداسیون ژن هدف فاقد

---

<sup>۱</sup> Primer extension

موتاسیون به نانوپروب، قدرت مقاومت نانوپروب در برابر اثر القایی سدیم کلراید افزایش پیدا کرده و محلول رنگ قرمز خود را حفظ می کرد (۱۱۰، ۱۱۱).

۷. در سال ۲۰۰۸ Hou و همکارانش در موسسه ی تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشگاه ملی تائپیی تایوان موفق به شناسایی پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی با استفاده از نانوپروب و آنزیم نوکلئاز شدند. در روش آنها DNA بعد از برش با آنزیم نوکلئاز با نانوپروب و پروب اختصاصی تحت کنترل دمایی مجاور و هیبرید می شد که در صورت وجود پلی مورفیسیم در ژن هدف و متعاقبا هیبریداسیون، محلول رنگ قرمز خود را حفظ می کرد (۱۱۲).

۸. در سال ۲۰۰۹ Javier و همکارانش در دپارتمان مهندسی زیستی تگزاس آمریکا با استفاده از روش CL موفق به شناسایی mRNA کد کننده ی پروتئین شوک حرارتی انگل کریپتواسپورییدیوم پارووم<sup>۱</sup> بر روی یک اسلای شیشه ای شدند. در روش آنها مقداری از نانوپروب هیبرید شده با DNA هدف بر روی اسلاید شیشه ای منتقل و تغییرات رنگ توسط نرم افزار آنالیز رنگ مورد بررسی قرار می گرفت (۱۱۳).

۹. در سال ۲۰۱۰ Park همکارانش در موسسه ی علوم و تکنولوژی کره در یک رویه ی مبتنی بر NCL اقدام به شناسایی باکتری کلامیدیا<sup>۲</sup> عامل عفونت ادراری نمودند. در آزمایش آنها از پرایمر تیوله جهت تکثیر ژن مربوطه استفاده شده بود. در این روش در صورت عدم حضور ژن هدف، نانوپروب ها تجمع یافته و منجر به تغییر رنگ محلول از قرمز به ابی-ارغوانی می شدند (۱۱۴).

۱۰. در سال ۲۰۱۱ Cheulhee jung و همکارانش در کره جنوبی با استفاده از روش NCL اقدام به شناسایی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس نمودند. مطالعه ی آنها مبتنی بر ترکیبی از یک روش تکثیر هم دما

---

<sup>۱</sup> Cryptosporidium parvum

<sup>۲</sup> Chlamydia trachomatis

و روش رنگ سنجی توسط نانوذرات طلا بود. آنها در روش خود از یک پروب سیگنال دهی کایمر DNA-RNA-DNA استفاده کردند که می توانست به DNA هدف متصل شود، بعد از اتصال ناحیه ی RNA توسط RNAaseH شکافته شده و پروب سیگنال دهی از DNA هدف جدا و امکان اتصال آن بایک پروب سیگنال دهی دیگر را فراهم می کرد به این ترتیب حین تکثیر هم دما همراه با تکثیر DNA هدف پروب سیگنال دهی نیز افزایش می یافت. در صورت حضور توالی هدف با افزودن محلول نانوپروب ها پروب های سیگنال دهی توسط RNAaseH شکافته شده و نانوپروب ها به توالی هدف متصل و مانع تجمع نانوذرات شده و محلول رنگ قرمز به خود می گرفت. در حالی که در غیاب مولکول هدف پروب های سیگنال دهی با اتصال به نانوپروب ها بر روی نانوذرات مختلف و ایجاد رابط RNA باعث تجمع آنها و ایجاد رنگ آبی در محلول می شد (۱۱۵).

۱۱. در سال ۲۰۱۱ Lee و همکارانش در مرکز تحقیقات علوم زیست-پزشکی دانشگاه کره در کره ی جنوبی با استفاده از روش CL اقدام به شناسایی موتاسیون پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی<sup>۱</sup> (SNP) در ژن BRCA1 سرطان پستان نمودند در آزمایش آنها در حضور ژن هدف فاقد موتاسیون ، دو نانوپروب با مولکول هدف هیبرید شده و منجر به تجمع شبکه ای نانو پروب و DNA هدف و تغییر رنگ متمایل به آبی-ارغوانی می شد (۱۱۶).

۱۲. در سال ۲۰۱۲ Padmavathy و همکارانش در دانشگاه پوندیچری هند با روش مبتنی بر NCL و یک نانوپروب، ژنوم تکثیر نشده ی باکتری اشیریشیا کلی را شناسایی نمودند آنها در این آزمایش از اسید هیدروکلریک اسید به منظور القای تجمع نانوذرات استفاده کردند همچنین جهت جلوگیری از احتمال

---

<sup>۱</sup> Single nucleotide polymorphism (SNP)

همپوشانی با سایر باکتری ها و شناسایی ویژه ی باکتری مورد نظر اقدام به طراحی پروب ویژه ی ژنوم اش‌ریشیاکلی نمودند در غیاب ژن هدف نانوپروب ها در مجاورت اسیدکلریدریک مجتمع شده و تغییر رنگ متمایل به آبی-ارغوانی مشاهده می گردید (۱۰۵).

۱۳. در سال ۲۰۱۳ Margarita و همکارانش در دانشگاه کشاورزی آتن با استفاده از نانوپروب طلا اقدام به شناسایی گونه های لشم‌انیا در نمونه های بالینی نمودند. آنها در مطالعه ی خود ابتدا نواحی ژنومی مختلف لشم‌انیا را توسط PCR تکثیر و متعاقب آن با چهار نوع نانوپروب طراحی شده بر اساس توالی های حفظ شده در میان گونه های لشم‌انیا، به منظور انتخاب توالی ژنومی با اختصاصیت و حساسیت بالا مجاورت نمودند. عدم تغییر رنگ محلول حاوی نانوپروب و نیز پیک جذبی نانوذرات طلا بعد از مجاورت با نمونه های مورد نظر مبین هیبریداسیون نانوپروب و ناحیه ی ژنی مکمل و حساسیت روش فوق بوده است (۱۱۷).

۱۴. در سال ۲۰۱۳ T sung-Ting Tsai و همکارانش در دانشکده ی پزشکی دانشگاه چانگ گونگ تایوان، با استفاده از نانوذرات طلا و یک روش آنالیزی مبتنی بر کاغذ<sup>۱</sup> اقدام به شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نمودند. آنها در روش تشخیصی خود از توانایی پروب تک رشته ای و توالی ژنی هدف دو رشته ای در اتصال به نانوذرات بدون پوشش بهره گرفتند و در نهایت جهت آنالیز نتایج رنگ سنجی از یک ابزار مبتنی بر کاغذ (مانند کاغذ سلولوزی)، با مقایسه ی نسبت نقاط آبی به قرمز رنگ تشکیل شده بر روی آن به عنوان یک روش مقرون به صرفه استفاده کردند (۱۱۸).

---

<sup>۱</sup> Paper-based



۱۵- در سال ۲۰۱۴ Hossein AhmadpourYazdi و همکاران در دانشگاه شهید بهشتی ایران با استفاده از روش NCL پلی مورفسم تک نوکلئوتیدی را در ژن بقای نورون حرکتی<sup>۱</sup> (SMN) بیماری تحلیل عضلانی- نخاعی<sup>۲</sup> (SMA) را شناسایی کردند آنها در آزمایش خود اقدام به بررسی وضعیت نمونه های بالینی افراد سالم، ناقل و بیمار نمودند که DNA افراد سالم بانسبت بیشتری نسبت به ناقلین و بیماران با نانو پروب هیبرید شده و تغییر رنگ جزئی ایجاد شد میزان تجمع نانو پروب در نمونه های بیماران به شدت افزایش یافته و تغییر رنگ فاحشی از قرمز به بنفش مشاهده می شد (۱۱۹, ۱۲۰).

۱۶. در سال ۲۰۱۴ Fabio Ferreira و همکاران در مرکز تحقیقات ژنتیک مولکولی انسانی دانشگاه جدید لیسیون پرتغال با استفاده از روش NCL اقدام به شناسایی پلی مورفسم تک نوکلئوتیدی در ژنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت ژن FTO در افراد مبتلا به چاقی با زمینه ی ژنتیکی نمودند آزمایش آنها مبتنی بر استفاده از یک نانو پروب تیوله مکمل ژن حاوی SNP بود که ژن مورد نظر بعد از تکثیر توسط PCR با نانو پروب مجاور شد با اتصال نانو پروب به ژن مکمل خود تجمع نانوذرات به دلیل ممانعت فضایی صورت نگرفته و محلول رنگ قرمز خود را حفظ کرد (۱۲۱).

۱۷. در سال ۲۰۱۴ Wai-sing chan و همکارانش در بخش پاتولوژی بیمارستان و آسایشگاه هنگ کنگ چین روش NCL (نانوذره ی کونژوگه با پروب) را جهت شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین بر روی محصولات PCR به کاربردند آنها از نانو پروب اختصاصی ناحیه ی ژنی 23s rRNA استافیلوکوکوس اورئوس جهت شناسایی گونه و از نانو پروب اختصاصی ژن mecA-PBP2A جهت تایید ویژگی مقاومت به متیسیلین استفاده کردند که در صورت حضور گونه ی استافیلوکوکوس

<sup>1</sup> Survival of motor neuron (SMN)

<sup>2</sup> Spinal Muscular Atrophy (SMA)

اورئوس مقاوم به متیسیلین محلول رنگ خود (قرمز) را به دلیل عدم تجمع نانوذرات ناشی از هیبریداسیون نانوپروب و DNA هدف حفظ می کرد (۱۲۲).

۱۸. در سال ۲۰۱۵ Bruno veigas و همکارانش در دانشگاه جدید لیسبون پرتغال در یک روش NCL با استفاده از یک نانوپروب دو پاتوژن متفاوت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و گونه های پلاسمودیوم را شناسایی کردند آزمایش آنها مبتنی بر استفاده از یک نانوذره ی طلا ی عامل دار شده با الیگونوکلوئوتیدهای اختصاصی برای هر دو هدف ژنی بود که این نانوپروب توانایی شناسایی هر کدام از توالی های هدف رابه صورت جداگانه ونیز در صورت حضور هر دو توالی در یک مخلوط multiplex را دارا بود (۱۲۳).

۱۹. در سال ۲۰۱۵ Prayanka Rajendran و همکارانش در موسسه ی مهندسی پزشکی سوئیس با استفاده از روش CL اقدام به شناسایی مولکول های DNA سنتتیک کوتاه با پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی نمودند در آزمایش آنها با اتصال دو نانوپروب به مولکول هدف که هر کدام مکمل نیمی از آن بودند نانوذرات به یکدیگر نزدیک شده وتغییر رنگ از قرمز به آبی-ارغوانی مشاهده می شد یافته های آنها مبین قدرت روش CL در تشخیص پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در حد فمتومتر بود (۱۲۴).

۲۰. در سال ۲۰۱۵ Mona Saleh و همکارانش در دانشگاه دامپزشکی اتریش با استفاده از روش NCL (نانوذره ی تنها در مجاورت پروب) اقدام به شناسایی DNA تکثیر نشده ی سیپرینید هرپس ویروس<sup>۱</sup> نمودند در این آزمایش DNA هدف در صورت وجود، با پروب مکمل خود هیبرید شده و با افزودن نانوذرات، به دلیل اتصال پروب به ژن هدف ،نانوذرات آزاد مجتمع شده و رنگ محلول از قرمز به آبی تغییر می کند ولی در صورت حضور DNA غیر مکمل پروب به نانوذرات متصل ومانع از تجمع وتغییر رنگ آنها می شد (۱۲۵).

---

<sup>۱</sup>Cyprinid herpesvirus- 3

۲۱. در سال ۲۰۱۶ Ru-Dong Li و همکارانش در دانشکده شیمی و مهندسی شیمی دانشگاه شیچی چین از روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا به همراه واکنش تکثیرنمایی هم دما جهت شناسایی miRNA-221-3P در سرطان کبد استفاده کردند در آزمایش آنها پروب حسگر متصل به نانوذره ی طلا حاوی سه دومین : ۱-انتهای ۵' پلی آدنیلی که با فسفوتیوات جهت اتصال به سطح نانوذرات طلا بلوک شده بود ، ۲-دو توالی تکراری مکمل miRNA هدف، ۳- دو توالی اختصاصی یکسان جهت شناسایی توسط آنزیم اندونوکلاز، این پروب در حضور مولکول هدف از انتهای ۳' خود با آن هیبرید شده که به دنبال این هیبریداسیون آنزیم پلی مراز طی واکنش تکثیر نمایی هم دما و در حضور مولکول های دئوکسی ریبونوکلوئید شروع به طویل سازی miRNA هدف در امتداد نانوپروب می کرد سپس مولکول DNA فوقانی تکثیر شده توسط آنزیم اندونوکلاز Nt-BstNBI جهت آزاد سازی قطعات کوتاهی که دارای توالی یکسانی با مولکول هدف بودند برش خورده و هر قطعه ی آزاد شده ، دوباره به نانوپروب دیگر متصل و دور جدیدی از تکثیر نمایی را شروع می کرد در واقع به همراه پلی مریزاسیون، پروب به طور کامل از سطح نانوذرات جدا می شد که در نتیجه نانوذرات تنها در حضور نمک مجتمع شده که منجر به کاهش باند جذبی در ۵۲۰ و افزایش آن در ۶۵۰ می شد که نسبت جذب  $A_{650}/A_{520}$  با غلظت miRNA هدف متناسب بود بدین ترتیب این روش امکان تعیین کمی miRNA موردنظر را فراهم آورده بود (۱۲۶).

۲۲. در سال ۲۰۱۶ Xun Gao و همکارانش در گروه شیمی و علوم محیط زیست، موسسه فناوری نیوجرسی آمریکا با استفاده از روش شبکه ای اقدام به شناسایی ۸-اکسو گوانین به عنوان بیومارکر سرطان ناشی از آسیب های DNA نمودند. آنها از نانوپروب های طلا جهت ساخت یک گیرنده ی سه گانه بهره گرفتند. این گیرنده از نانوذرات طلا متصل به دو رشته ی DNA غنی از پیریمیدین غیر مکمل و یک

رشته ی سوم غنی از پورین به عنوان رابط القاگر تجمع نانوذرات ساخته شده بود. نتایج مطالعات آنها نشان دهنده ی تشکیل ساختار DNA سه تایی متصل به نانوذره در حضور آنالیت (۸-اکسو گوانین) و ایجاد رنگ قرمز-صورتی در غلظت های مختلف آنالیت بود، بدین ترتیب که در غلظت های کم و نیز نمونه های فاقد آنالیت رنگ محلول قرمز بوده در حالی که حضور مقادیر بالای آنالیت منجر به تشکیل کمپلکس سه تایی نانوذره ی طلا- آنالیت-DNA، نزدیک شدن نانوذرات به یکدیگر و ایجاد رنگ صورتی در محلول می شد (۱۲۷).

۲۳. در سال ۲۰۱۶ Yossef Alnasser و همکارانش در در ایالات متحده ی امریکا، با استفاده از نانوذرات طلا اقدام به شناسایی پلاسمودیوم ویواکس، عامل مالاریای انسانی نمودند. آزمایش آنها مبتنی بر استفاده از نانوپروب های اختصاصی C-ترمینال و N-ترمینال (با اختصاصیت بیشتر) پروتئین ایمونوژنیک مروزوئیت<sup>۱</sup> (MSP10) بود که در صورت حضور توالی DNA مربوط به پروتئین MSP10 در نمونه ی ادرار بیماران، الیگونوکلئوتیدهای متصل به نانوذرات طلا به دلیل تشکیل ساختار دو رشته ای با DNA الگو و ایجاد نیروی دافعه ی قوی مانع تجمع نانوذرات طلا شده و محلول رنگ قرمز خود را حفظ می کرد (۱۲۸).

۲۴. در سال ۲۰۱۶ Yoshitsugu Akiyama و همکارانش در دانشکده ی علوم صنعتی و فناوری توکیو ژاپن، با استفاده از نانوپروب طلا در یک رویکرد NCL اقدام به شناسایی SNP در اگزون ۵ ژن مونواکسیژناز سیتوکروم P450 نمودند. روش تشخیصی آنها مبتنی بر توانایی هیبرید DNA دورشته ای متشکل از نانوپروب و توالی هدف (پرایمر نوع یابی<sup>۲</sup>) حاوی یک تک نوکلئوتید در انتهای آزاد پرایمر، در ایجاد ممانعت الکترواستاتیک و نیز ممانعت فضایی، در فرآیند تجمع نانو پروب نسبت به هیبرید دو رشته

<sup>1</sup> Merozoite Surface Protein 10 (MSP10)

<sup>2</sup> Typing primer

ای با انتهای صاف بوده است. جایگاه SNP در این ژن شامل جایگزینی نوکلئوتید گوانین با آدنین می باشد. مشاهدات آنها نشان داد که در صورت عدم وجود پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، پرایمر مورد نظر در حضور نوکلئوتید گوانین به اندازه ی یک نوکلئوتید طولی شده و پس از تشکیل هیبرید با نانوپروب (مکمل پرایمر گسترش نیافته) یک تک نوکلئوتید آویزان در انتها ایجاد می کرد که از طریق ممانعت فضایی و الکترواستاتیک مانع تجمع و تغییر رنگ نانوذرات می شد. همچنین فرآیند عدم تغییر رنگ برای نمونه های حاوی SNP در حضور تیمین صدق می کرد (۱۰۳، ۱۲۹).

۲۵. در سال ۲۰۱۷ Sherif M و همکارانش در دپارتمان زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی دانشگاه شفیلد مصر روش NCL (نانوپروب) را برای تشخیص RNA ویروس هپاتیت C به کار بردند. آنها در آزمایش خود جهت ارزیابی حضور RNA ویروسی از نانوذرات کاتیونی cysteamin به جای نمک به منظور القای تجمع نانوپروب استفاده کردند به این ترتیب که در صورت حضورتوالی هدف در نمونه، نانوپروب با RNA ویروسی هیبرید شده و RNA تا می خورد که سطحی برای قرارگیری نانوذرات کاتیونی ایجاد و مانع از برخورد و تجمع آنها با نانوپروب می شد و محلول رنگ (قرمز) خود را حفظ می کرد ولی در نمونه های فاقد توالی هدف، نانوپروب تک رشته ای مانده و با افزودن نانوذرات کاتیونی با آنها مجتمع شده و رنگ محلول به بنفش تغییر می کرد (۱۳۰).

۲۶. در سال ۲۰۱۷ Bo Hu و همکارانش در دپارتمان زیست شناسی مولکولی و بیوشیمی دانشگاه پزشکی چین، با استفاده از روش NCL اقدام به شناسایی microRNA Lethal-7a در رده های سلولی سرطانی هلا و A549 نمودند. رویکرد تشخیصی آنها از ترکیب روش تکثیردایره ی غلتان<sup>۱</sup> (RCA) با روش رنگ سنجی نانوپروب طلا بهره گرفته بود. آنها از یک پروب قفل مانند<sup>۲</sup> حلقوی که حاوی یک توالی مکمل

<sup>۱</sup> Rolling circle amplification (RCA)

<sup>۲</sup> Padlock probe

برای اتصال الیگونوکلوئوتید هدف و یک توالی به عنوان الگوی تکثیری (Oligo-A) بود استفاده کردند. با افزودن نمونه ی مورد تشخیص، توالی هدف در صورت حضور به عنوان پرایمر DNA پلی مرارز عمل کرده و فرآیند تکثیر به روش تکثیر دایره‌ای غلتان انجام می شد که منجر به ایجاد یک توالی تک رشته ای طویل حاوی توالی های تکراری از مکمل OligoA (توالی هدف-OligoA) می گردید. با مجاورت سیستم واکنشی RCA و نانوپروب، Au-NP- oligoA و OligoA طی فرآیند هیبریداسیون منجر به تجمع نانوپروب ها و ایجاد رنگ آبی می شد (۱۳۱).

۲۷. در سال ۲۰۱۸ Cong Kong و همکارانش با استفاده از روش تکثیر هم دما با واسطه ی تشکیل حلقه<sup>۱</sup> (LAMP) نانوذرات طلا عاملدار شده با استرپت آویدین اقدام به شناسایی DNA ویروس عامل گاستروانتریت<sup>۲</sup> نمودند. آنها در آزمایش خود از چهار پرایمر اختصاصی DNA ویروس جهت تکثیر توسط روش هم دما و نیز دو پرایمر حلقه<sup>۳</sup> (پرایمرهای مکمل قطعه ی تکثیر شده) که با بیوتین عاملدار شده بودند استفاده کردند. در این روش تشخیصی پس از تکثیر قطعه ی هدف توسط پرایمرهای اختصاصی، دو پرایمر بیوتینه به محلول واکنش افزوده می شدند که با DNA تکثیر شده ادغام و پس از افزودن Avidin-AuNps و واکنش اتصالی بین آویدین و بیوتین خوشه های DNA-AuNps تشکیل می شدند. در اثر این خوشه سازی و مجاورت نانوذرات طلا تغییر رنگ از قرمز به آبی-ارغوانی که مبین حضور قطعه ی هدف بود مشاهده می گردید (۱۳۲).

۲۸- در سال ۲۰۱۸ Mostafa R و همکاران در مصر، با استفاده از نانوذرات طلا در یک روش NCL اقدام به شناسایی ویروس عامل تب دره ای<sup>۴</sup> (RVFV) نمودند. در مطالعه ی آنها نمونه ی حاوی ژنوم

<sup>1</sup> Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

<sup>2</sup> Gastroenteritis

<sup>3</sup> Loop primers

<sup>4</sup> Rift Valley fever virus (RVFV)

ویروسی در مجاورت با محلول واکنشی نانوذرات طلا و پروب اختصاصی RNA ویروس، با پروب الیگونوکلوئوتیدی مکمل هیبرید شده و نانوذرات تعدیل نیافته در اثر القای نمکی مجتمع شده و محلول تغییر رنگ می داد ولی در نمونه ی فاقد RNA ویروسی پروب به نانوذرات متصل شده و با حفظ حالت کلوئیدی، مانع از تجمع و تغییر رنگ آنها می شد (۱۳۳).

۲۹. در سال ۲۰۱۸ Hongfeilt و همکارانش در دانشکده ی شیمی دانشگاه سیچوان چین از نانوذرات طلا در یک روش رنگ سنجی و بدون نیاز به تکثیر انزیمی اقدام به شناسایی اهداف اسید نوکلئیکی نمودند. آنها در آزمایش خود از پنج نوع پروب سنجاق سری که مکمل یکدیگر و نیز دارای انتهای چسبده بودند استفاده کردند. بدین صورت که DNA هدف، در صورت حضور با یکی از پروب های سنجاق سری که طی فرآیندی باز شده بود هیبرید شده و به عنوان آغازگر تجمع و هیبریداسیون سایر پروب های سنجاق سری جهت تشکیل نانوذرات DNA عمل می کرد. در مرحله ی آخر قطعه ی ژنی هدف از پروب جدا شده و به عنوان آغازگر یک مسیر تجمع خودبه خودی دیگر قرار می گرفت (افزایش تعداد نانوذرات DNA و تقویت سیگنال) با افزودن نانوذرات طلا به محلول واکنش نانوذرات DNA که از انتهای چسبده به یکدیگر متصل شده اند به دلیل ممانعت الکترواستریک به نانوذرات طلا متصل نشده و در نتیجه تجمع نانوذرات برهنه منجر به تغییر رنگ محلول به ابی- ارغوانی می شد در حالی که در نمونه ی فاقد DNA هدف، پروب ها از انتهای چسبده ی خود به نانوذرات طلا متصل و رنگ قرمز محلول را حفظ می کردند (۱۳۴).

۳۰. در سال ۲۰۱۸ Amy M و همکارانش در دانشکده ی علوم گیاهی و میکروبی دانشگاه ایالت میشیگان آمریکا، از نانوذرات طلا بدون پوشش در یک رویه ی NCL جهت شناسایی DNA نوعی از پاتوژن

گیاهی بهره گرفتند. آنها در روش تشخیصی خود از دکستین<sup>۱</sup> به عنوان عامل کلاhek گذاری در سنتز نانوذرات استفاده کرده بودند. در آزمایش آنها فرایند هیبریداسیون و تغییر رنگ در دو سری وکنش میان DNA ژنومیک مورد سنجش و پروب اختصاصی آن، و نیز یک DNA غیر مرتبط و همان پروب مقایسه شده بود. بدین صورت که پس از افزودن پروب و نانوذرات طلا به محتوای واکنش های فوق با دناتوراسیون DNA هدف دو رشته ای و هیبریداسیون آن با پروب اختصاصی، تک رشته ی ژنومیک دیگر که دناتوره شده به نانوذرات متصل مانع تجمع آنها و در نتیجه پایداری رنگ محلول (قرمز) می شد. گرچه نتایج آنها مبین پایداری بالای نانوذرات عاملدار شده با دکستین نسبت به نانوذرات سیتراته در برابر اثر القایی سدیم کلراید بود، ولی در حضور پروب اختصاصی فارغ از شیمی سطح، پایداری نانوذرات به دلیل دافعه ی الکترواستریک افزایش یافته بود (۱۳۵).

---

<sup>۱</sup> Dextrin



## فصل سوم

### مواد و روش ها

## فصل-۳) مواد و روش ها<sup>۱</sup>

### ۳-۱) اهداف و فرضیات

#### ۳-۱-۱) هدف کلی<sup>۲</sup>:

شناسایی باکتری اوره آپلازما اوره آلتیکوم توسط روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا

#### ۳-۱-۲) اهداف اختصاصی<sup>۳</sup>:

الف) ساخت نانوپروب (DNA-نانوپروب)

ب) بارگذاری پروب بر روی نانوذرات طلا

پ) بهینه‌سازی غلظت پروب

ت) بهینه‌سازی غلظت القاگر ( $MgCl_2$ )

#### ۳-۱-۴) اهداف کاربردی:

دسترسی به یک روش رنگ سنجی جهت تشخیص افراد مبتلا به عفونت اوره آپلازما اوره آلتیکوم.

#### ۳-۱-۴) فرضیات و سوالات پژوهش<sup>۴</sup>:

با استفاده از پروب متصل به نانوذرات طلا می توان باکتری اوره آپلازما اوره آلتیکوم را تشخیص داد.

---

<sup>1</sup> Materials and Methods

<sup>2</sup> Goal

<sup>3</sup> Objectives

<sup>4</sup> Hypothesis

### ۳-۱-۵) متغیرهای<sup>۱</sup> پژوهش:

جدول ۳-۱) جدول متغیرها

نام متغیر	نوع متغیر	نقش متغیر	تعریف علمی متغیر	نحوه و واحد اندازه‌گیری
نانوذرات	کمی	مداخله‌ای	اندازه ی نانوذرات	TEM,DLS نانومتر
DNA	کمی	مستقل	غلظت DNA	نانوگرم
پروب	کمی	مستقل	غلظت پروب	نانومول
NaCl or MgCl <sub>2</sub>	کمی	مستقل	غلظت NaCl or MgCl <sub>2</sub>	چشمی میلی مولار
طیف جذب	کمی	وابسته	پیک طیف جذب	Uv –vis Spectrophotometer or (NanoDrop) نانومتر
تجمع نانوذرات	کیفی	وابسته	تجمع فقدان یا وجود نانوذرات	Uv –vis Spectrophotometer نانومتر

<sup>1</sup> Variables

### ۲-۳) نوع مطالعه:

مطالعه‌ی حاضر از نوع کاربردی می‌باشد.

### ۳-۳) جامعه‌ی مورد مطالعه:

در این مطالعه روش تشخیصی بر روی محصول تکثیری حاصل از سازه‌ی ژنی حاوی ژن اوره‌آز باکتری اوره

آپلازما اوره آلیتیکوم بهینه گردید.

### ۴-۳) روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار اکسل، نرم افزار گراف‌پد پریسم و آزمون آماری One Way ANOVA

Tuky test استفاده گردید.

### ۵-۳) ملاحظات اخلاقی:

در این تحقیق به دلیل کار بر روی محصولات تکثیری حاصل از سازه‌ی ژنی، ملاحظات اخلاقی خاصی وجود

ندارد. این پایان‌نامه با کد شناسه‌ی اختصاصی IR.QUMS.REC.1395.231 در سامانه‌ی اخلاق دانشگاه علوم

پزشکی قزوین ثبت گردیده است.

### ۶-۳) تجهیزات مورد استفاده:

- دستگاه ترموسایکلر مدل Primus شرکت بیوتک - آمریکا

- دستگاه ترموسایکلر مدل ABI , Veriti - Applied Biosystem - آمریکا

- سانترفیوژ یخچال دار شرکت Froilab - فرانسه
- تانک الکتروفورز و منبع تغذیه ی برق تانک الکتروفورز شرکت پایاپژوهش - ایران
- دستگاه UK- Real time electrophoresis
- دستگاه UV Tranilluminator - آمریکا
- یخچال ۴ درجه درجه ی سانتیگراد
- فریز ۲۰- درجه ی سانتیگراد
- ترازوی آنالیتیکال مدل METTLER TOLEDO-Ms-105
- دستگاه تهیه ی آب خالص فاقد یون شرکت آب سازان- ایران
- صفحه ی گرم کننده با قابلیت همزن مغناطیسی مدل DELTA-HM\_101 - ایران
- دستگاه pH سنج شرکت ترانس- سنگاپور
- مگنت
- دستگاه طیف سنج مدل UV-Vis spectrophotometr: 8-DR6000
- دستگاه طیف سنج نانودراپ مدل USA - ND1000
- میکروسکوپ الکترونی<sup>۱</sup> مدل CM30 200 KV

---

<sup>۱</sup> Transmission Electron Microscope (TEM)

- دستگاه اندازه گیری کننده ی اندازه و بار نانوذرات<sup>۱</sup> Zetasizer: Nano ZS (England, Malvern)

- دستگاه ورتکس شرکت کیاژن- آمریکا

- شیکر چرخشی زمان دار با قابلیت کنترل دمایی - Vision scientific - کره

- ظروف شیشه ای: بالن ژوژه، بالن ته گرد دو دهنه، کندانسور، ارلن، استوانه ی مدرج، بشر

- سمپلر مدل Nichipet Premium- شرکت Nichiryo - ژاپن

- سر سمپلر

- میکروتیوب

- فالکون (۱۵ و ۵۰ میلی لیتر)

- فویل آلومینیومی

۳-۷) مواد و کیت ها:

- کیت خالص سازی محصول PCR :

- BIONEER - (Accuaprep PCR Purification-Cat.No.k-3034, K-3034-1) - کره

- ستون کروماتو گرافی Nap-5 (GE Healthcare life science) - آمریکا

- آنزیم DNA پلیمراز Taq و نشانگر اندازه ی<sup>۲</sup> مولکولی - یکتا تجهیزآزما- ایران

---

<sup>۱</sup> Dynamic Light scatter (DLS)

<sup>۲</sup> Size marker (ladder)

- نمک سدیم سیترات تری بازیکی دی هیدرات<sup>۱</sup> ساخت شرکت سیگما (خلوص بالای ۹۹٪) - آمریکا

- نمک هیدروژن تترا کلرواورات تری هیدرات<sup>۲</sup> ساخت شرکت سیگما (خلوص بالای ۹۹/۹۹٪) - آمریکا

- نمک سدیم فسفات دی بازیکی<sup>۳</sup> ساخت شرکت سیگما (خلوص بالای ۹۸/۵٪) - آمریکا

- نمک سدیم فسفات مونوبازیکی<sup>۴</sup> ساخت شرکت سیگما (خلوص بالای ۹۸٪) - آمریکا

- نمک سدیم کلرید<sup>۵</sup> ساخت شرکت سیگما (خلوص بالای ۹۸٪) - آمریکا

- نمک دی تیوتریتول<sup>۶</sup> ساخت شرکت سیگما - آمریکا

- نمک سدیم دودسیل سولفات<sup>۷</sup> تهیه شده از شرکت سیناژن - ایران

- نمک سدیم آزید<sup>۸</sup> ساخت شرکت سیگما - آمریکا

- هیدروکلریک اسید ساخت شرکت Merck - آلمان

- نیتریک اسید ساخت شرکت Merck - آلمان

- سدیم هیدروکسید ساخت شرکت Chemlab - بلژیک

- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید<sup>۹</sup> ساخت شرکت سیگما

---

<sup>۱</sup> Sodium citrate tribasic dehydrate ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )

<sup>۲</sup> Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ )

<sup>۳</sup> Sodium phosphate dibasic ( $Na_2HPO_4$ )

<sup>۴</sup> Sodium phosphate monobasic ( $NaH_2PO_4$ )

<sup>۵</sup> Sodium chloride ( $NaCl$ )

<sup>۶</sup> Dithiothreitol (DTT)

<sup>۷</sup> Sodium dodecyl sulfate (SDS)

<sup>۸</sup> Sodium azide ( $NaN_3$ )

<sup>۹</sup> Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

### ۸-۳) محلول های مورد استفاده:

در این مرحله تمام محلول ها بر اساس پروتکل ارائه شده در مقاله ی Hill (۱۳۶) تهیه و سپس pH آنها با استفاده از دستگاه pH سنج که از قبل کالیبره شده بود، مورد سنجش قرار گرفت.

### ۸-۳-۱) بافر مخصوص شکستن پیوند دی سولفیدی<sup>۱</sup> (حاوی ۱۷۰ میلی مول بافر فسفات):

به منظور تهیه ی این بافر مقدار ۲/۲۹۳۶ گرم سدیم فسفات دی بازیک و ۰/۱۰۱۸ گرم سدیم فسفات مونوبازیک در ۸۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر در دمای اتاق حل شده و سپس pH محلول با افزودن حجم مناسبی از سدیم هیدروکسید روی ۸ تنظیم شده وبا آب فاقد یون به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

### ۸-۳-۲) بافر شستشو<sup>۲</sup> (حاوی ۱۰ میلی مول بافر فسفات + ۱۵۰ میلی مول نمک سدیم کلرید):

به منظور تهیه ی این بافر مقادیر ۰/۱۱۲۴ گرم سدیم فسفات دی بازیک، ۰/۰۲۵ گرم سدیم فسفات مونو بازیک و ۰/۸۷۶۶ گرم نمک سدیم کلرید در ۸۰ میلی لیتر آب فاقد یون در دمای اتاق حل شدند. سپس pH با افزودن حجم مناسبی از سدیم هیدروکسید/هیدروکلریک اسید روی ۷/۴ تنظیم شده و حجم نهایی با آب دوبار تقطیر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

<sup>۱</sup> Disulfide cleavage buffer

<sup>۲</sup> Washing buffer



۳-۸-۳) بافر نمکی<sup>۱</sup> (حاوی ۱۰ میلی مول بافر فسفات + ۲ مول نمک سدیم کلرید):

به منظور تهیه ی این بافر مقدار ۰/۰۵۶۲ گرم سدیم فسفات دی بازیك، ۰/۰۱۲۵ گرم سدیم فسفات مونوبازیک و ۵/۸۴۴ گرم نمک سدیم کلرید در ۳۰ میلی لیتر آب فاقد یون در دمای اتاق حل شد. سپس pH محلول با افزودن حجم مناسبی از هیدروکلریک اسید روی ۷ تنظیم و با آب دو بار تقطیر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

۳-۸-۴) بافر تنظیم کننده ی فسفات<sup>۲</sup> (حاوی ۱۰۰ میلی مول بافر فسفات):

به منظور تهیه ی این بافر مقدار ۰/۵۶۲ گرم سدیم فسفات دی بازیك و ۰/۱۲۵ گرم سدیم فسفات مونوبازیک در ۳۰ میلی لیتر آب فاقد یون در دمای اتاق حل شد و سپس pH با افزودن مقدار مناسبی از هیدروکلریک اسید روی ۷ تنظیم و محلول با آب فاقد یون به حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

۳-۸-۵) محلول سورفاکتانت<sup>۳</sup> ۱۰٪ وزنی - حجمی:

به منظور تهیه ی این محلول ۱ گرم سدیم دو-دسیل سولفات در ۹ میلی لیتر آب فاقد یون حل گردید.

۳-۸-۶) بافر سنجش<sup>۴</sup> (حاوی ۱۰ میلی مول بافر فسفات + ۳۰۰ میلی مول نمک سدیم کلراید + سدیم

دو-دسیل سولفات ۰/۱٪ وزنی - حجمی + سدیم آزاید ۰/۰۱٪ وزنی - حجمی):

به منظور تهیه ی این محلول مقدار ۰/۰۲۵ گرم سدیم فسفات مونوبازیک، ۰/۱۱۲۴ گرم سدیم فسفات دی بازیك و ۰/۰۱ گرم سدیم آزاید در ۸۰ میلی لیتر آب فاقد یون در دمای اتاق حل شد و سپس pH با افزودن حجم مناسبی از سدیم هیدروکسید روی ۷/۴ تنظیم گردید در نهایت بعد از افزودن ۱ میلی لیتر (معادل ۰/۰۱ گرم سدیم دو-

<sup>1</sup> Salting buffer

<sup>2</sup> Phosphate adjustment buffer

<sup>3</sup> Surfactant solution

<sup>4</sup> Assay buffer

دسیل سولفات) از محلول سور فاکتانت ۱۰٪ وزنی-حجمی، محلول با آب فاقد یون به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

### ۷-۸-۳) محلول دی تیوتریتول:

جهت تهیه ی این محلول، ۰/۰۲۴۶۸ گرم DTT در ۱ میلی لیتر بافر مخصوص شکستن پیوند دی سولفیدی حل گردید.

### ۸-۸-۳) محلول TBE<sup>۱</sup> (1X):

جهت تهیه ی این محلول، ۱۰/۸ گرم پودر تریس و ۵/۵ گرم بوریک اسید در دمای اتاق در ۸۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید و به آن ۴ میلی لیتر محلول EDTA افزوده شده و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

### ۹-۸-۳) محلول سدیم سیترات تری بازیک دی هیدرات (۳۸/۸ میلی مول):

جهت تهیه ی این محلول مقدار ۰/۲۸۶۶ گرم نمک سیترات سدیم در دمای اتاق در ۲۰ میلی لیتر آب فاقد یون حل گردید و سپس با آب فاقد یون به حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر رسانده شد.

### ۱۰-۸-۳) محلول هیدروژن ترا کلرواورات تری هیدرات (۱ میلی مول):

جهت تهیه ی این محلول، ۰/۱ گرم نمک طلا در دمای اتاق در ۲۰۰ میلی لیتر آب خالص فاقد یون حل گردید و سپس با آب خالص فاقد یون به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

<sup>۱</sup> A buffer solution containing a mixture of Tris base, Boric acid and EDTA

### ۳-۹) پروب و پرایمرهای مورد استفاده:

به منظور شناسایی ژن اوره آز باکتری UU در طراحی پروب مورد نظر نهایت دقت مبذول و فاکتورهای ذیل در آن لحاظ گردید تا با توالی قطعه ی مورد نظر از ژن اوره آز اختصاصیت کامل داشته و امکان تشابه با توالی های مشترک حفظ شده در بین این باکتری و ارگانسیم های دیگر به حداقل برسد:

۱- پروب مورد نظر با طول ۲۳ نوکلئوتید طراحی گردید تا اختصاصیت هیبریداسیون با توالی هدف فراهم شود (۱۳۷، ۱۳۸).

۲- از عدم وجود ساختارهای ثانویه نظیر لوپ، حالت های سنجاق سری و دایمر در توالی پروب با استفاده از سایت Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com>) و نیز نرم افزار Oligo 7 اطمینان حاصل گردید

۳- در ابتدای پروب مورد نظر یک فاصله دهنده<sup>۱</sup> حاوی توالی از نوکلئوتید آدنین ( ۶ نوکلئوتید) به کار برده شد تا پایداری نانوپروب را افزایش داده و نیز با کاهش جذب سطحی نواحی شناسایی پروب بر روی نانوذره (۱۳۷، ۱۳۹)، از ممانعت فضایی احتمالی در هیبریداسیون نانوپروب با توالی هدف اجتناب شود. از آنجایی که طول فاصله دهنده یکی از عوامل مهم (هم زدن<sup>۲</sup> محلول، بافر نمکی، طول فاصله انداز و میزان پروب بارگذاری شده) و تاثیرگذار در میزان هیبریداسیون نانوپروب با توالی هدف می باشد، به کارگیری طول بهینه ای از آن منجر به افزایش قدرت تشخیصی روش حاضر می شود. در این آزمایش با پیروی از مطالعه ای (۱۱۶، ۱۳۸) که در پی تعیین تعداد

---

<sup>۱</sup> Spacer

<sup>۲</sup> Stirring

بهینه‌ی نوکلئوتیدهای فاصله انداز، به میزان هیبریداسیون مطلوبی با پروب حاوی فاصله دهنده در محدوده‌ی ۱۰-

۶ نوکلئوتید دست یافته بود، از یک فاصله دهنده‌ی ۶ نوکلئوتیدی استفاده گردید.

اطلاعات مربوط به پرایمرها و پروب در جداول ۳-۱ و ۳-۲ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱) توالی پرایمرها و پروب. پروب و پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی از شرکت بیونر<sup>۱</sup> (کره‌ی جنوبی) تهیه گردیدند.

Oligonucleotides	Sequence (5'→3')
Urease forward primer	TGCTGGTGGTACAGGTATGAA
Urease reverse primer	GGAGCATGTCCACCACCA
Ureas thiol probe	HS- (CH <sub>2</sub> )-AAAAAAAA TTG AAC AAA TCG TAG CAG GTG

جدول ۳-۲) اطلاعات ضمیمه‌ی پروب سفارشی.

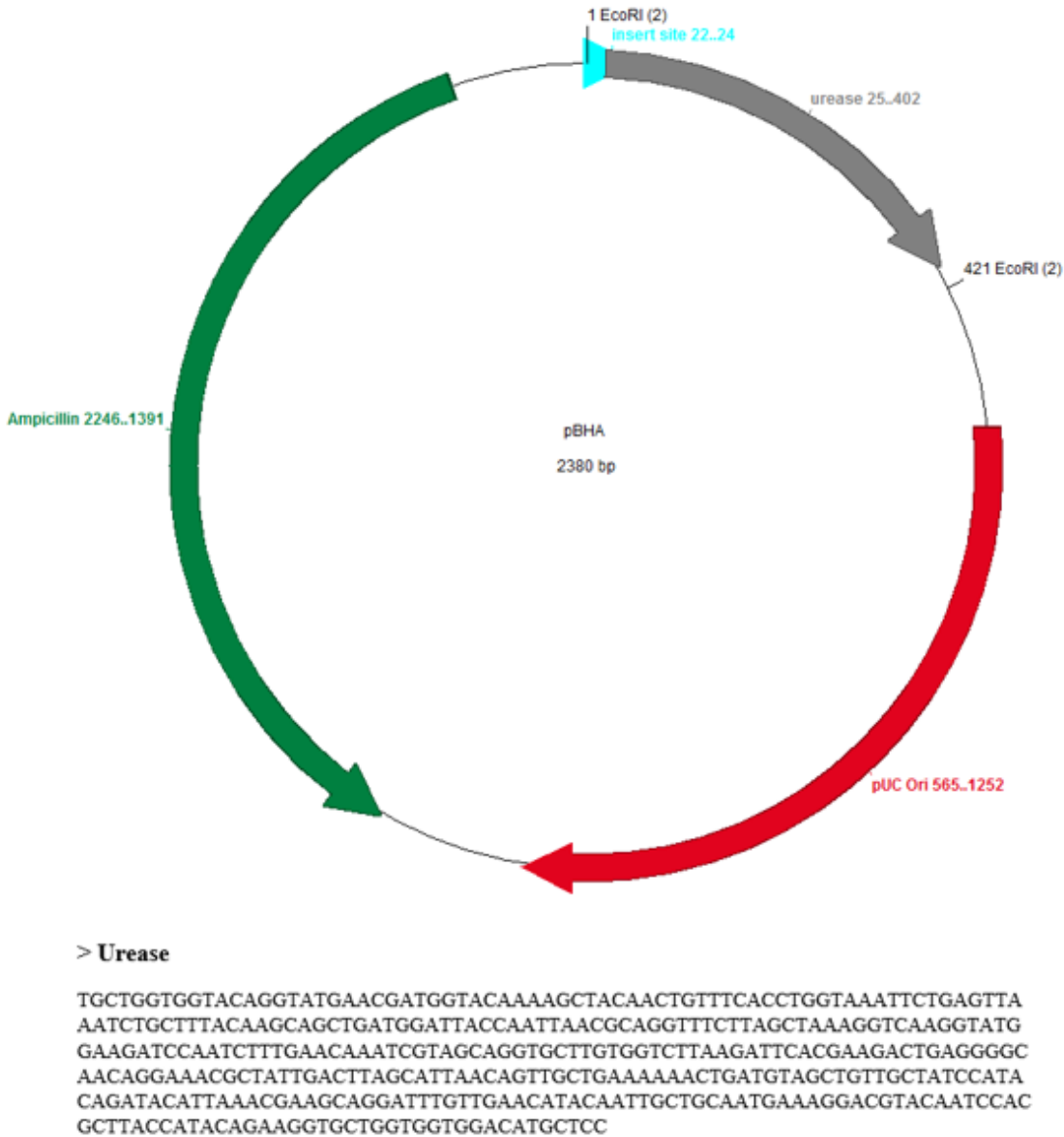
Sequence 5' → 3'	Yield [OD]	Yield [nmol]	Vol. for 100 pmol/μL	Purification -Modification
AAAAAAAA TTG AAC AAA TCG TAG CAG GTG (29)	14.7	47.2	472.4	HPLC -5' THI

<sup>۱</sup> Bioneer

### ۱۰-۳) حامل پلاسمیدی مورد استفاده:

در این تحقیق ژن اوره‌آز مورد تشخیص به صورت سنتتیک در سازه ی ژنی pBHA کلون شده بود که

از شرکت Bioneer تهیه گردید. (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳) اطلاعات مربوط به حامل پلاسمیدی و نیز توالی ژن اوره‌آز.

### ۱۱-۳) روش و تکنیک اجرای مطالعه:

در این مطالعه با استفاده از پروب الیگونیوکلوئیدی متصل به نانوذرات طلا در یک روش رنگ سنجی اقدام به شناسایی ژن *اوره آز* باکتری *اوره آلاسما/اوره آلیتیکوم* شده است. برای این منظور پس از ساخت نانوپروپ، روش تشخیصی بر روی محصولات تکثیری، از سازهی ژنی حاوی ژن *اوره آز* مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### ۱۱-۱۱-۳) تایید وجود ژن *اوره آز* در حامل پلاسمیدی:

با استفاده از تکثیر توسط پرایمرهای ژن *اوره آز*، از حضور قطعهی ژنی مورد نظر در حامل پلاسمیدی اطمینان حاصل گردید. در این مرحله با بهره گیری از قابلیت گرادیان دمایی دستگاه ترموسایکلر دمای اتصال پرایمر ها به ژن هدف در چهار دمای ۵۷/۵، ۵۷/۷، ۵۸ و ۵۸/۵ درجهی سانتیگراد مورد بهینه سازی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا غلظت های مورد نیاز برای تکثیر، با افزودن آب مقطر از پودر لیوفلیزه ی پلاسمید و نیز پرایمرها تهیه شد. جهت تهیهی محلول ذخیره ی اصلی از حامل پلاسمیدی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به پودر لیوفلیزه ی آن (با غلظت ۵ میکروگرم در میکرولیتر) افزوده شد. سپس یک رقت ۱/۲ (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) از ذخیره ی اصلی و به دنبال آن رقت ۱/۲۰ (با غلظت ۲۵۰۰ پیکوگرم در میکرولیتر) از رقت ۱/۲ و در نهایت رقت ۱/۱۰ ( با غلظت ۲۵۰ پیکوگرم در میکرولیتر، جهت تکثیر ) از رقت ۱/۲۰ با استفاده از آب تزریقی تهیه گردید. جهت تهیهی پرایمرها نیز ابتدا به پودر لیوفلیزه ی آنها به میزانی آب مقطر اضافه گردید تا غلظت ۵۰۰ پیکومول در میکرولیتر حاصل شود و سپس از محلول حاصل، یک رقت ۱/۲۰ حاوی (با غلظت ۲۵ پیکومول در میکرولیتر ( و در نهایت یک محلول ترکیبی<sup>۱</sup> از هردو پرایمر (هر یک با غلظت ۲۵ پیکومول در میکرولیتر، غلظت مورد نیاز برای واکنش تکثیری) با حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر تهیه گردید. واکنش تکثیری در حجم نهایی ۵۰

<sup>۱</sup>Primer Mix

میکرولیتر مطابق با مقادیر واکنشگرها و برنامه‌ی زمانی ارائه شده به ترتیب در جداول ۳-۳ و ۳-۴، اجرا شد و در ژل ۱/۵ درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه‌ی ژل آگارز ۱/۵ درصد، متناسب با ظرفیت سینی مورد استفاده (۲۵ میلی لیتر) ۰/۳۷۵ گرم پودر آگارز وزن گردیده و پس از حل شدن در ۲۵ میلی لیتر بافر TBE (1X) توسط حرارت به طور کامل جوشانده شد. پس از بستن دو طرف سینی با چسب شیشه‌ای و قراردادن شانه در داخل آن، محلول آگارز به آرامی در سینی ریخته شد و پس از سپری شدن زمان لازم برای بسته شدن ژل (حدود ۳۰ دقیقه)، چسب و شانه از سینی جدا و ژل همراه سینی داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE (1X) قرار داده شد.

جدول ۳-۳) حجم و ترکیب واکنشگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن اوره آز.

Reagent	Volume (μL)
10X PCR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5
dNTPs (10 mM each)	1
Primer mix (25pmol/μl)	2
DNA Template (250pg/μl)	1
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	<b>0.27</b>
D.d.W (Doble-distilled water)	40.73
Total Volume	50

جدول ۳-۴) برنامه ی زمانی مراحل PCR جهت تکثیر ژن اوره آز.

Stage		Temperature (°C)	Time (second)
Primary Denaturation		95	180
Cycle number (35)	Denaturation	95	30
	Annealing	58	30
	Extention	72	30
Final extention		72	300

### ۳-۱۱-۲) تکثیر قطعه ی ژنی غیر مرتبط:

در این مطالعه جهت بررسی اختصاصیت پروب نسبت به توالی هدف از یک توالی نوکلئیک اسیدی غیر مرتبط<sup>۱</sup> که از لحاظ طول توالی تقریباً مشابه قطعه ی ژنی مورد هدف پروب بود، استفاده شد (شکل ۳-۲). برای این منظور توالی ژنی *nuoD* با طول ۵۲۰ جفت باز<sup>۲</sup> متعلق به باکتری *استنوتروفوموناس مالتی فیلیا*<sup>۳</sup> با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۳-۵ و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مقادیر واکنشگرها و برنامه ی زمانی و دمایی ارائه شده به ترتیب در جداول ۳-۵ و ۳-۶ تکثیر شده و سپس کیفیت قطعه ی تکثیری با استفاده از آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت (۳-۹-۱).

#### >*nuoD*

CGCAACTACACCATGAACTTCGGCCCGCAGCATCCGGCCGCTCACGGTGTGCTGCGCCTGATCCTGGAAATGGACGGTGA  
AACCATCATGCGCGCCGACCCGCACGTGGGTCTGCTGCACCGTGGTACCGAAAAGCTGGCCGAGTCCAAGCCGTTCAACC  
AGTCGATCGGCTACATGGATCGACTGGATTACGTGTCGATGATGTGCAACGAGCACGCCTACGTGCGCGCATCGAGACC  
CTGATGGGCATCGAGGCGCCGGAGCGTGCGCAGTACATCCGCACCATGTACGACGAGATCACCCGCATCCTCAACCACCT  
GATGTGGCTGGGCTCCAACGCGCTCGACCTGGGTGCGATGGCGGTGATGCTGTACGCCTTCCGCGAGCGGAAGAGCTGA  
TGGACTGCTATGAAGCAGTCTCTGGCGCACGCATGCACGCGGCTACTACCGTCCGGGCGGTGTCTACCGCGACCTGCCG  
GACCACATGCCGAAGTACAAGGAGTCGCGCTG

شکل ۳-۲) توالی ژنی محصول غیر مرتبط (ژن *nuoD* باکتری *استنوتروفوموناس مالتی فیلیا*).

<sup>1</sup> Irrelevant

<sup>2</sup> base pair (bp)

<sup>3</sup> *Stenotrophomonas maltiphilia*



جدول ۳-۵) توالی پرایمرهای nuoD .

Oligonucleotides	Sequence (5'→3')
nuoD forward primer	TTCGCAACTACACCATGAAC
nuoD reverse primer	CAGCGCGACTCCTTGTACTT

جدول ۳-۶) حجم و ترکیب واکنشگرهای مورد استفاده جهت تکثیر nuoD .

Reagent	Volume (μL)
Doble-distilled water	16.05
10x PCR-Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	2.5
dNTPs (10 mM each)	2
Primer I (25 μM)	1
Primer II (25 μM)	1
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.2
DMSO	1
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	0.25
Template DNA	1
Total	25

جدول ۳-۷) برنامه ی زمانی مراحل PCR جهت تکثیر nuoD.

Stage		Temprature (°C)	Time (second)
Primary Dnaturation		95	540
Cycle number (30)	Denaturation	94	20
	Annealing	48	60
	Extention	72	50
Final extention		72	300

### ۳-۱۱-۳) ساخت نانوذرات طلا:

نانوذرات طلا در ابعاد زیر ۳۰ نانومتر با روش احیاء نمک طلا توسط سیترات سدیم (Frense و Natan ) سنتز شدند (۱۴۰، ۱۴۱). به طور خلاصه ۲۵۰ میلی لیتر محلول نمک طلا (غلظت ۱ میلی مول ) بر روی صفحه ی گرم کننده (با قابلیت همزن مغناطیسی) جوشانده شد و سپس در نقطه ی جوش ۲۵ میلی لیتر محلول نمکی سدیم سیترات تری بازیک دی هیدرات (با غلظت ۳۸/۸ میلی مول ) به آن اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه جوشیدن، حرارت قطع شده ولی فرآیند همزدن جهت یکنواخت شدن محلول ۱۵ دقیقه ی دیگر ادامه پیدا کرد. پس از سرد شدن، محلول فوق به ظروف شیشه ای منتقل گردید و برای جلوگیری از برخورد نور، اطراف ظروف فوق با فویل آلومینیومی پوشانده شد.

### ۳-۱۱-۳-۱) بررسی اندازه ی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ عبوری TEM:

جهت عکسبرداری از نمونه ی نانوذرات طلا توسط میکروسکوپ عبوری، بعد از تهیه ی رقت ۱/۲ از نمونه با استفاده از آب خالص فاقد یون و قرارگیری در دستگاه سونیکاتور (۳۵ کیلوهرتز، ۶۴۰ وات به مدت ۵ دقیقه،

مقداری از آن (میکرولیتتر) برداشته و روی شبکه ی مسی<sup>۱</sup> قرار گرفت. عکسبرداری در ۲۰۰ کیلو ولت انجام گرفت.

### ۳-۱۱-۲) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوذرات طلا:

توزیع اندازه ی نانوذرات توسط Zetasizer مورد بررسی قرار گرفت. جهت آماده سازی، ابتدا نمونه به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت و سپس توزیع اندازه ی آن بررسی گردید.

### ۳-۱۱-۳) بررسی ماکزیمم جذب نانوذرات:

ماکزیمم جذب نانوذرات طلا که با استفاده از آب فاقد یون به نسبت ۱/۱۰ رقیق شده بود، در محدوده ی طول موج های ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis اندازه گیری شد.

### ۳-۱۱-۴) تعیین غلظت و ضریب خاموشی:

غلظت تقریبی نانوذرات طلا توسط معادله ی ۱-۲ محاسبه گردید. محاسبه ی غلظت با فرض برابر بودن قطر نانوذرات و نیز احیاء کامل یون های  $Au^{+3}$  انجام گرفت.

$$C_{AuNPs} = \frac{M_{Au} \times C_{Au}}{\frac{4}{3}\pi r^3 \times \rho_{Au} \times A}$$

معادله ی ۱-۳) محاسبه ی غلظت نانوذرات طلا (۱۴۱).

در معادله ی فوق،  $M_{Au}$  جرم مولی نمک طلا (۱۹۶/۹۷ گرم بر مول)،  $C_{Au}$  غلظت یون های  $Au^{+3}$ ،  $r$  شعاع نانوذرات طلا،  $\rho_{Au}$  چگالی طلا (۱۹/۳۲ گرم بر سانتیمتر مکعب) و  $A$  عدد آووگادرو می باشد.

<sup>۱</sup> Mesh copper grids

پس از به دست آوردن غلظت نانوذرات از معادله ی ۱-۲، و ماکزیمم جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، ضریب خاموشی با استفاده از معادله ی بیر-لامبرت (معادله ی ۲-۲) محاسبه گردید (۱۴۲).

$$A = \epsilon bc \quad \text{معادله ۲-۳} \quad \text{معادله ی بیر-لامبرت (۱۴۲)}.$$

A ماکزیمم جذب نانوذرات،  $\square$  ضریب خاموشی (مول<sup>-۱</sup> سانتی متر<sup>-۱</sup>)، b طول سل (سانتی متر) و C غلظت نانوذرات (نانومول).

### ۳-۱۱-۴ ساخت نانوپروب:

به منظور ساخت نانوپروب مکمل اوره‌از، پروب‌های الیگونوکلیوتیدی تیوله با طول ۲۹ نوکلئوتید به نانوذرات حاصله متصل گردیدند (۱۳۶). برای این منظور پروب مورد نظر جهت دست یابی به غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر در مقدار مشخصی آب فاقد یون استریل حل گردید. پس از احیاء ۶۰ میکرولیتر (۶ نانومول) از پروب تیوله در محلول DTT (۰/۱ مول تهیه شده در بافر فسفات (۱۷۰ میلی مول، ) pH=8, به مدت ۲-۳ ساعت، پروب ها طبق مراحل ذیل توسط ستون کروماتوگرافی NAP-5 نمک زدائی شدند:

۱. ابتدا و انتهای ستون جهت خارج سازی بافر نگهدارنده‌ی ستون جدا گردید.

۲. ستون توسط ۱۰ میلی لیتر آب فاقد یون شستشو داده شد (حدود سه برابر حجم ستون).

۳. پروب احیاء شده توسط DTT (۱۶۰ میکرولیتر) به ستون افزوده و با آب دیونیزه به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

۴. پس از ورود کامل نمونه به ستون، ۹۵۰ میکرولیتر آب فاقد یون به ستون افزوده شد و خروجی ستون به ازای هر سه قطره در میکروتیوب های ۲ میلی لیتری جمع آوری گردیده و غلظت پروب در هر میکروتیوب توسط دستگاه نانودراپ ND1000 تعیین شد.

۵. در این مرحله چهار غلظت مشخص از پروب جمع آوری شده در مرحله ی ۴، برای ساخت نانو پروب محاسبه و هر یک از مقادیر محاسبه شده با ۱ میلی لیتر از محلول نانوذرات در داخل فالكون ترکیب شد. فالكون های مورد نظر بعد از پوشیده شدن در فویل آلومینیومی به مدت ۱۶ ساعت روی شیکر (با سرعت ۱ هرتز < ۶۰-۵۰ دور در دقیقه<sup>۱</sup>) قرار گرفتند و پس از سپری شدن این زمان بافر تنظیم کننده فسفات (بافر فسفات، ۱۰۰ میلی مول) pH= 7 طبق معادله ی (۳-۳) به آنها افزوده شد.

$$۱۰/ \text{حجم کل محلول به میکرولیتر} = \text{حجم بافر تنظیم کننده فسفات}$$

معادله ی (۳-۳) محاسبه ی حجم مورد نیاز از محلول بافر تنظیم کننده فسفات.

۶. در این مرحله جهت ممانعت از تجمع نانوذرات و افزایش کارایی شستشو در مراحل بعدی محلول SDS (۱۰٪) طبق معادله ی (۴-۳) به محلول مورد نظر افزوده شد.

$$۱۰/ (\times \text{حجم نهایی محلول در مرحله ی ۵ به میکرولیتر}) = \text{حجم محلول SDS}$$

معادله (۴-۳) محاسبه ی حجم مورد نیاز از محلول SDS.

<sup>۱</sup> round per minutes (rpm)

۷. محلول حاصل جهت جلوگیری از برخورد نور در یک فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. سپس بافر نمکی (بافر فسفات ۱۰۰ میلی مول، نمک سدیم کلراید ۲ مول،  $\text{pH} = 7$ ) طبق معادله ی (۳-۵) به محلول مورد نظر، در حالی که روی شیکر قرار داشت طی ۶ مرحله اضافه گردید تا غلظت نهایی سدیم کلراید به ۰/۳ مول رسید.

$$۲ \text{ مول} / ۰/۳ \text{ مول} (\times \text{حجم نهایی محلول در مرحله ی } ۵ \text{ به میکرولیتر}) = \text{حجم محلول بافر نمکی}$$

معادله ۳-۵) محاسبه ی حجم مورد نیاز از بافر نمکی.

۸. پس از آخرین مرحله ی افزودن بافر نمکی، محلول حاصل جهت به توازن رسیدن به مدت یک شبانه روز روی شیکر قرار گرفت (با سرعت ۱ هرتز < ۶۰-۵۰ دور در دقیقه). سپس با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه ی سانتیگراد و به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جهت شستشو با ۱ میلی لیتر از بافر شستشو (بافر فسفات ۱۰ میلی مول، نمک سدیم کلراید ۱۵۰ میلی مول) جابه جا شد. مرحله ی شستشو ۴ بار تکرار شده و پس از آخرین مرحله ی سانتریفیوژ مایع رویی با ۱ میلی لیتر بافر سنجش (بافر فسفات ۱۰ میلی مول، نمک سدیم کلراید ۰/۳ مول + محلول سدیم آزاید ۰/۰۱٪،  $\text{pH} = 7.4$ ) جابه جا گردید.

### ۳-۱۱-۴) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوپروب:

برای این منظور ابتدا رقت ۱/۳ از نانوپروب تهیه و بعد از قرار گیری در معرض امواج اولتراسونیک، توزیع اندازه ی آنها توسط Zetasizer بررسی گردید.

### ۳-۹-۴) تعیین ماکزیمم جذب نانوپروب:

برای این منظور پس از تهیه ی رقت ۱/۱۰ از نمونه ی نانوپروب، ماکزیمم جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis تعیین گردید.

### ۳-۹-۴) تعیین غلظت نانوپروب:

با جایگزینی □ به دست آمده از بخش ۳-۹-۳ و ماکزیمم جذب محلول نانوپروب (حاصل از آنالیز اسپکتروفتومتری) در معادله ی بیر-لامبرت (معادله ی ۳-۲)، غلظت نانوپروب محاسبه گردید.

### ۳-۱۱-۴) تایید اتصال پروب به سطح نانوذره:

در این مرحله تایید بارگذاری پروب بر روی نانوذرات طلا از طریق آزادسازی پروب های تیوله از سطح نانوذرات طلا توسط محلول DTT (با غلظت ۰/۱۶ مول تهیه شده در بافر مخصوص شکستن پیوند دی سولفیدی حاوی بافر فسفات ۱۷۰ میلی مول) صورت گرفت. برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از پروب تیوله با ۱۰ میکرولیتر از محلول DTT مجاور شده و تغییرات طیف پیک جذبی و نیز رنگ محلول مورد بررسی قرار گرفت.

### ۳-۱۱-۵) بهینه سازی روش تشخیصی:

در ابتدا دو اقدام اولیه لازم جهت بهینه سازی روش تشخیصی، که در ذیل ذکر شده انجام شد:

**الف) تخلیص محصول تکثیری:** در این مرحله محصول حاصل از تکثیر جهت حذف پرایمر- دایمر و نیز

مواد تداخل کننده (آنزیم و نوکلئوتید) ناشی از فرآیند تکثیر، توسط Accuaprep PCR Purification kit و

طبق دستورالعمل کیت فوق و به شرح ذیل تخلیص گردید:

۱. محصول PCR با یک مقدار ۵ برابر حجم خود، از بافر اتصالی PCR ترکیب شده (برای مثال ۵۰۰ میکرولیتر بافر به ازای ۱۰۰ میکرولیتر از محصول تکثیری) و به طور کامل توسط ورتکس مخلوط گردید.
۲. ترکیب حاصل از مرحله ی ۱ به ستون تخلیص که بر روی تیوب جمع آوری قرار گرفته بود منتقل و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق) سانتریفیوژ گردید.
۳. مایع جمع شده در تیوب جمع آوری خارج شده و دوباره ستون تخلیص روی آن قرار گرفت.
۴. به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو به ستون تخلیص اضافه و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق) سانتریفیوژ گردید.
۵. مایع جمع شده در تیوب خارج شده و ستون تخلیص دوباره بر روی تیوب جمع آوری قرار گرفت.
۶. فرآیندهای مراحل ۴ و ۵ تکرار شدند.
۷. جهت حذف اتانول اضافه و انتقال ستون تخلیص بر روی میکروتیوب جدید، ستون تخلیص با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق) سانتریفیوژ گردید.
۸. ستون تخلیص بر روی میکروتیوب جدید منتقل شده و ۳۰ میکرولیتر بافر خارج سازی به مرکز ستون تخلیص اضافه و جهت خارج سازی ۳-۱ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.
۹. خارج سازی قطعات DNA توسط سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق) صورت گرفت سپس غلظت محصول تکثیری خالص شده توسط دستگاه نانودراپ تعیین و در یخچال ۴ درجه ی سانتیگراد نگهداری شد.



ب) تغلیظ نانوپروب: جهت تغلیظ نانوپروب به منظور افزایش شدت رنگ، محلول نانوپروب با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته شده و باقی محلول با پلت نانوپروب برای استفاده در فرآیند ارزیابی روش تشخیصی، کاملاً ترکیب گردید.

### ۳-۱۱-۵) بررسی میزان پایداری نانوپروب در برابر اثر القایی نمک منیزیم کلرید:

منیزیم کلراید ( $MgCl_2$ ) به دلیل دارا بودن قدرت نمکی بالاتر نسبت به سدیم کلراید، می‌تواند در غلظت وحجم پایین تری جهت رسوب نانوپروب به کار گرفته شده و بر مشکل افزایش رقت و کاهش شدت رنگ نانوپروب، ناشی از به کار گیری حجم بالایی از سدیم کلراید (۵ مولار) که منجر به مشکل در رنگ سنجی چشمی و طیف گیری می‌شود، غلبه کند. از این رو در این رویه ی تشخیصی از منیزیم کلراید به عنوان عامل القاگر تجمع نانوپروب استفاده گردید. برای این منظور، حجم های مختلفی از منیزیم کلراید ۰/۲ مولار با ۱۳ میکرولیتر از محلول نانوپروب (حاوی ۶ میکرولیتر از نانوپروب تغلیظ شده و ۷ میکرولیتر بافر-Tris-Cl) مجاور گردید. و با بررسی پایداری نانوپروب کم ترین مقدار از نمک که منجر به القای رسوب نانوپروب و متعاقباً تغییر رنگ محلول (از صورتی به طوسی) می‌شد به عنوان حجم بهینه جهت فرآیند تشخیصی در نظر گرفته شد.

### ۳-۱۱-۵-۲) بررسی روش تشخیصی بر روی نمونه ی تکثیری:

جهت شناسایی قطعه‌ی تکثیری مربوط به ژن اوره آز باکتری مربوطه از رویه های به کار گرفته شده در مطالعات پیشین مشابه (۱۰۵, ۱۴۳) الگو گرفته شد. در این روش برای افزایش شدت رنگ و در نتیجه توانایی و سهولت تفکیک چشمی، نانوپروب حاصل تغلیظ و سپس مورد استفاده قرار گرفت.

فرآیند تشخیصی بر روی قطعه ی ژنی اوراز، پس از تکثیر طبق پروتکل ارائه شده در بخش ۱۱-۳ و تخلیص بخش ۱۱-۳ صورت گرفت همچنین قطعه ی ژنی غیر مرتبط بعد از تکثیر (۱۱-۳-۵) تخلیص شده و به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. محصول تکثیری تخلیص شده ی قطعه ی ژنی هدف پس از تعیین غلظت، به شرح ذیل مورد آزمایش قرار گرفت: مقادیر متفاوتی (بر حسب غلظت مورد نظر) از محصول تکثیری در ۹ بازه ی غلظتی و نیز یک غلظت از محصول غیر مرتبط با ۶ میکرولیتر از نانوپروب تغلیظ شده در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری ترکیب و حجم نهایی واکنش با تریس (Tris-cl) به عنوان بافر هیبریداسیون و نیز محلول پایه ی محصول تکثیری به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد (جدول ۳-۷). سپس نمونه ها جهت انجام فرآیند دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه ی سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند بعد از انکوباسیون، نمونه ها جهت اتصال نانوپروب به رشته ی هدف به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. پس از سپری شدن این زمان، مقدار ۱/۱ میکرولیتر از محلول  $MgCl_2$  به همه ی نمونه ها به جز نانوپروب افزوده شده و پس از سپری شدن مدت زمان ۳۰-۲۰ دقیقه طیف گیری از نمونه ها توسط دستگاه نانودراپ ND1000 انجام شد. در این مرحله پس از روشن کردن دستگاه و کالیبراسیون خودکار<sup>۱</sup> آن، دستگاه توسط ۲ میکرولیتر محلول شاهد (Tris-cl) بلانک گردیده و سپس نمونه ها مورد طیف گیری قرار گرفتند. جهت تفسیر شدت تجمع نانوذرات، آنالیز طیف ها به صورت بررسی خصوصیات پیک پلاسمون دربرگیرنده ی جابه جایی پیک، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه<sup>۲</sup> و نیز نسبت شدت جذب در دو طول موج ۶۵۰ و ۵۲۴ نانومتر (۶۵۰/۵۲۴ نانومتر) انجام شد.

<sup>۱</sup> Auto-calibration

<sup>۲</sup> Full width at half maximum (FWHM)

جدول ۳-۸) اجزای آزمایش روش تشخیصی مبتنی بر نانوذرات طلا.

محصول غیر مرتبط	نمونه‌ها	کنترل منفی	نانوپروب	
۳/۴۶	---	۷	۷	Tris-Cl (10 mM) (μl)
۶	۶	۶	۶	Au nanoprobe (17.12 nM) (μl)
۳/۵۴	۷	-----	-----	Purified PCR products (μl)
۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	Final volume (μl)

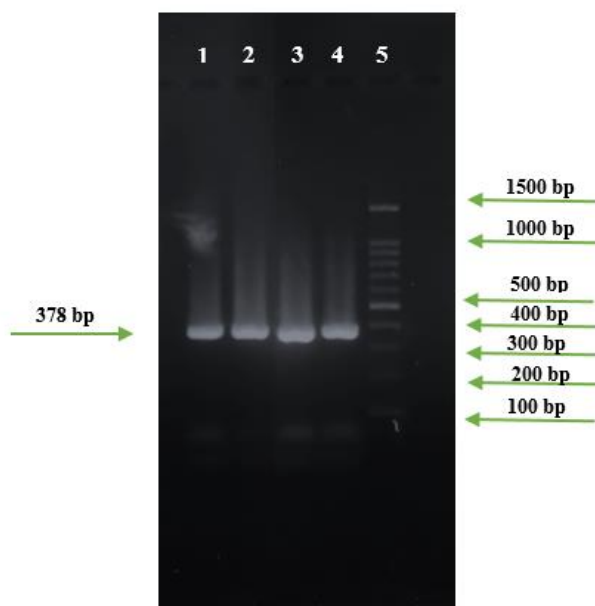
# فصل چہارم

## نتائج

## فصل ۴) نتایج<sup>۱</sup>

### ۴-۱۱-۱) تایید وجود ژن اوره‌آز در حامل پلاسمیدی:

در این مرحله واکنش تکثیری بر روی حامل پلاسمیدی به منظور حصول اطمینان از وجود قطعه‌ی مورد نظر و نیز بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها در چهار دمای ۵۸، ۵۷/۵، ۵۷/۷ و ۵۷/۵ سانتیگراد با استفاده از پرایمرهای مربوط به قطعه‌ی ژنی مورد نظر صورت گرفت (جدول ۳-۴). بررسی کیفی محصول تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تاییدی بر حضور قطعه‌ی ژنی اوره‌آز با طول ۳۷۸ جفت باز بود که باند مربوط به نمونه‌ی تکثیر شده در دمای ۵۸ درجه از شدت بیشتری برخوردار بود (شکل ۴-۱).

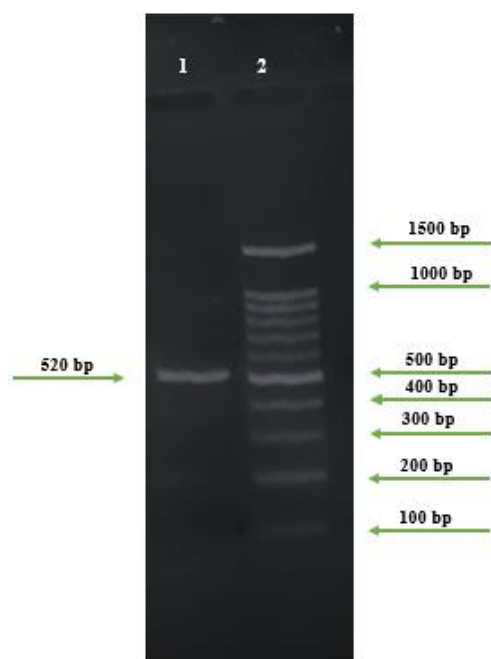


شکل ۴-۱) تصویرالکتروفورز مربوط به تایید وجود قطعه‌ی ژنی اوره‌آز در حامل پلاسمیدی و بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها در ژل ۱/۵٪ آگارز. ۱، ۲، ۳، ۴- به ترتیب مربوط به واکنش‌هایی با دمای اتصال پرایمر ۵۷/۵، ۵۷/۷، ۵۸ و ۵۸/۵ درجه‌ی سانتیگراد ۵- نشانگر اندازه‌ی مولکولی ۱۰۰ جفت باز.

<sup>۱</sup> Results

#### ۴-۱۱-۲) تکثیر قطعه‌ی ژنی غیرمرتبط:

دراین مرحله تکثیر *nuoD* طبق پروتکل های ارائه شده در جداول ۳-۶ و ۳-۷ تکثیر گردید و سپس تکثیر آن توسط بررسی بر روژل آگارز ۱/۵ درصد، با مشاهده توالی مورد نظر در موقعیت بالای نشانگر مولکولی ۵۰۰ جفت بازی تایید گردید (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۲) تصویر الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه‌ی ژنی غیرمرتبط. ۱- محصول *nuoD* ۲- نشانگر اندازه‌ی مولکولی ۱۰۰ جفت باز.

#### ۴-۱۱-۳) ساخت نانوذرات طلا:

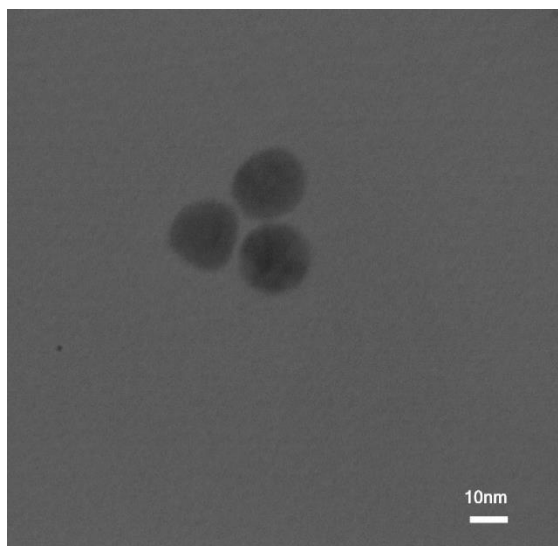
علاوه بر رنگ قرمز- ارغوانی تیره نانوذرات طلا که مبین ساخت موفقیت‌آمیز آنها بود، آنالیزهای حاصل از DLS, TEM و نیز ماکزیمم جذب<sup>۱</sup> آنها تاییدی بر سنتز مطلوب نانوذرات بود.

<sup>۱</sup>  $\lambda_{max}$

#### ۴-۱۱-۳) بررسی اندازه‌ی نانوذرات طلا با استفاده از میکروسکوپ عبوری TEM:

نتایج حاصل از عکسبرداری از نانوذرات طلا توسط دستگاه Philips CM30 در ولتاژ ۲۰۰ کیلو ولت نشان

دهنده‌ی قطری حدود ۱۵ نانومتر برای آنها بود (شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳) تصویر میکروسکوپ TEM از نانوذرات طلا. با نوار مقیاس ۱۰ نانومتر.

#### ۴-۱۱-۲) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوذرات طلا :

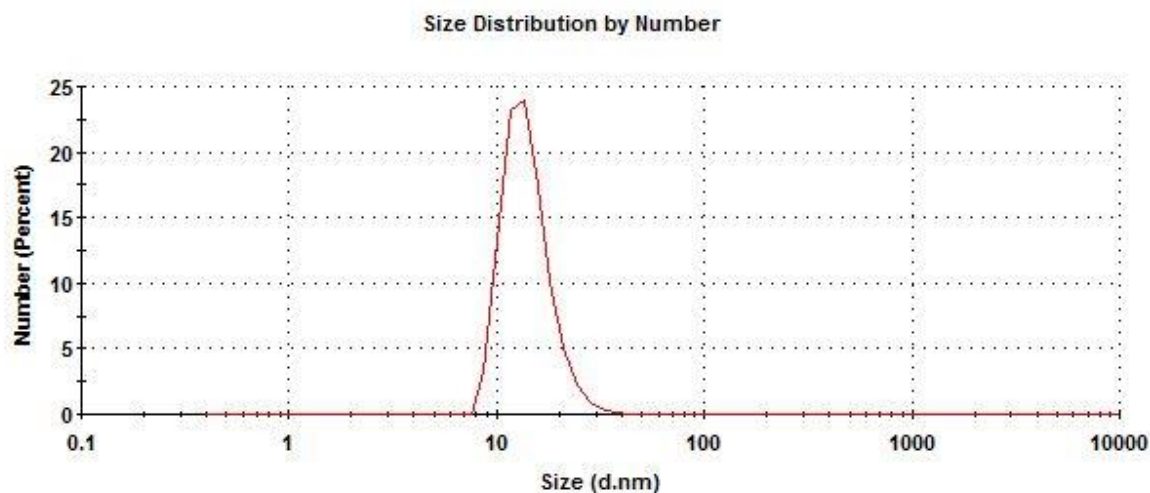
توزیع اندازه‌ی نانوذرات طلا ( بر حسب تعداد٪) توسط دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفت که نتایج

حاصل از آن مبین قطری حدود ۱۴/۲۱ نانومتر و در همخوانی با نتایج عکسبرداری توسط TEM بود.

بار الکتریکی و شاخص پراکندگی<sup>۱</sup> نانوذرات نیز به ترتیب برابر با ۳۱/۱- میلی ولت و ۰/۲۸۸ بود

(شکل ۴-۴).

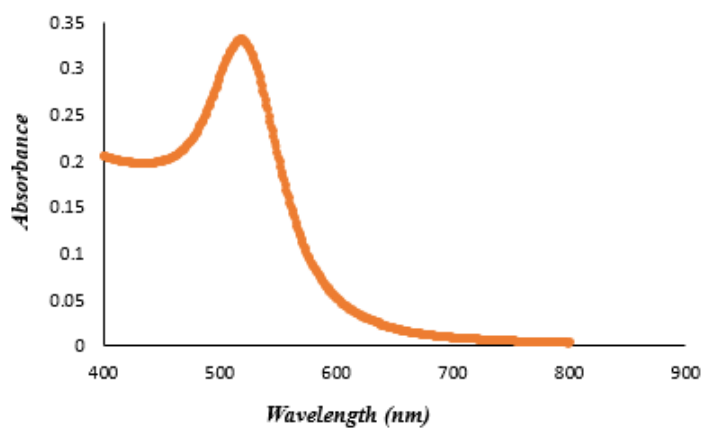
<sup>۱</sup> Poly dispersity index (PDI)



شکل ۴-۴) تصویر توزیع اندازه‌ی نانوذرات طلا توسط DLS.

#### ۴-۱۱-۳) بررسی ماکزیمم جذب نانوذرات:

ماکزیمم جذب بدست آمده از اسپکتروفتومتر UV-Vis برای نانوذرات طلا ساخته شده برابر با ۰/۳۳۱ و در محدوده‌ی طول موج ۵۲۰-۵۱۸ نانومتر بود که پس از ضرب در ضریب رقت (۱۰) برابر با ۳/۳۱ شد (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۵) طیف جذبی نانوذرات طلا حاصل از اسپکتروفتومتر UV-Vis.



۴-۱۱-۳) تعیین غلظت و ضریب خاموشی نانوذرات:

با استفاده از معادله‌ی ۱-۲ غلظت نانوذرات طلا محاسبه گردید (بخش ۳-۱۱-۳-۴). در این معادله با معلوم بودن مقادیر پارامترهای  $C_{Au}$  غلظت یون‌های طلا  $Au^{3+}$  (۱ میلی مول)،  $M_{Au}$  جرم مولی طلا (۹۷/۱۹۶ گرم بر مول)،  $r$  شعاع نانوذرات (۷/۱ نانومتر)،  $A$  عدد آووگادرو ( $6.02 \times 10^{23}$ ) و  $\rho_{Au}$  چگالی طلا (۱۹/۳۲ گرم بر سانتی متر مکعب) غلظت نانوذرات طلا حدود ۱۱ نانومول برآورد شد. سپس با استفاده از غلظت محاسبه شده از معادله‌ی فوق و ماکزیمم جذب اندازه‌گیری شده محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (۳/۳۱) ضریب خاموشی ( $\square$ ) نانوذرات از طریق معادله‌ی بیر-لامبرت (۲-۲) محاسبه گردید که مقداری برابر با  $3.009 \text{ مول}^{-1} \text{ سانتی متر}^{-1}$  بود.

۴-۱۱-۳-۵) تعیین تعداد اتم نانوذرات طلا:

با در نظر گرفتن قطر تقریبی نانوذرات طلا ( $D=15\text{ nm}$ ) حاصل از آنالیزهای TEM و با استفاده از معادله‌ی ۴-۱ تعداد اتم‌های نانوذرات طلا  $104274$  اتم برآورد شد.

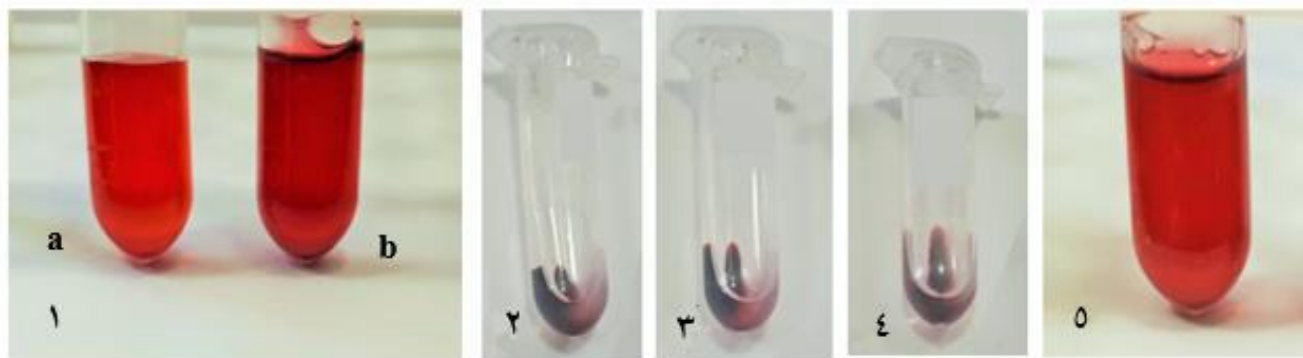
$$N = 30.89602 D^3$$

معادله‌ی ۴-۱) محاسبه‌ی تعداد اتم‌های نانوذرات طلا (۱۴۲).

۴-۱۱-۴) ساخت نانویروب:

تشکیل رسوب سیال و روغنی شکل نانوپروب ساخته شده در هر چهار غلظت پروب (۰/۷، ۰/۸۵، ۰/۹، ۱، نانومول)، پس از چندین مرحله سانتریفیوز طی فرآیند شستشو و عدم تغییر رنگ نشان دهنده‌ی عدم تجمع

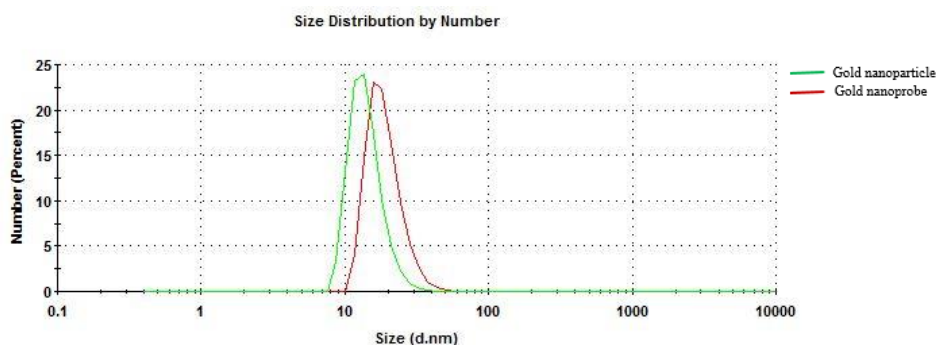
و در نتیجه سنتز موفقیت آمیز نانوپروب بود. همچنین نتایج حاصل از بررسی های DLS, TEM و ماکزیمم جذب حاکی از ساخت مطلوب نانوپروب بود (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶) ساخت نانوپروب. ۱- مقایسه‌ی رنگ نانوذره (a) با نانوپروب (b) ۲، ۳، ۴- رسوب محلول سیال و روغنی شکل نانوپروب پس از شستشو و سانتریفیوژهای مکرر ۵- محلول قرمز رنگ نانوپروب پس از مخلوط رسوب حاصل سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتیگراد.

#### ۴-۱۱-۴) بررسی توزیع اندازه و بار الکتریکی نانوپروب:

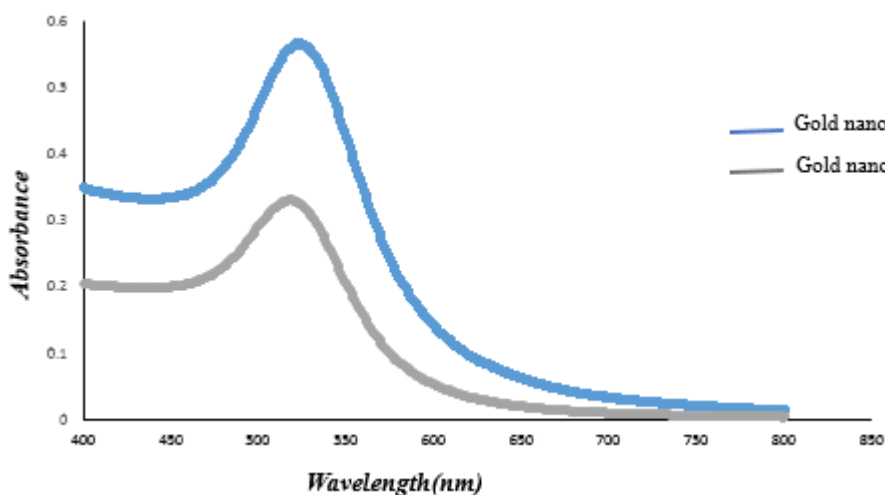
آنالیزهای حاصل از دستگاه DLS مبین توزیع اندازه‌ای حدود ۱۹/۰۷ (بر حسب تعداد %) و شاخص پراکندگی برابر با ۰/۴۹۱ برای نانوپروب بود. بار الکتریکی اندازه‌گیری شده برای آن نیز برابر با  $-۲۸/۹\text{mV}$  بود (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷) مقایسه‌ی توزیع اندازه‌ی نانوپروب به وسیله‌ی DLS. آنالیز توزیع اندازه‌ی نانوپروب در رقت ۱/۳ پس قرارگیری در معرض امواج التراسونیک به مدت ۱۰-۵ دقیقه.

#### ۴-۱۱-۲) بررسی ماکزیمم جذب نانوپروب:

بررسی‌های حاصل از طیف سنجی مبین ماکزیمم جذب نانوپروب ساخته شده در محدوده‌ی ۵۲۳-۵۲۶ نانومتر بود (شکل ۴-۸). میزان جذب اندازه‌گیری شده برای محلول نانوپروب برابر با ۰/۵۶۷ بود که پس از ضرب در ضریب رقت برابر با ۵/۶۷ شد.



شکل ۴-۸) مقایسه‌ی بین طیف‌های نانوپروب با نانوذره توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis.

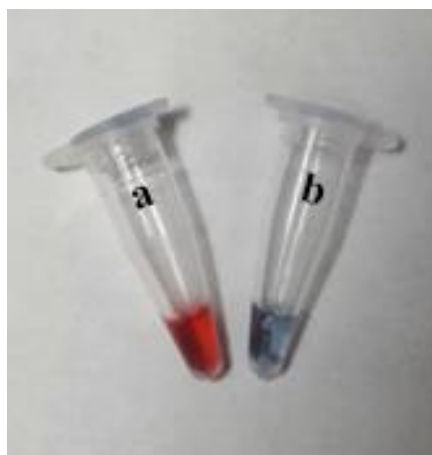
#### ۴-۱۱-۳) تعیین غلظت نانوپروب:

با مشخص بودن شدت جذب نانوپروب (۵/۶۷) و نیز ضریب خاموشی محاسبه شده از بخش ۴-۱۱-۳-۴ (۳/۰۰۹ مول<sup>-۱</sup> سانتی‌متر<sup>-۱</sup>) غلظت نانوپروب توسط معادله‌ی بیرلامبرت (معادله‌ی ۲-۲) برابر با ۱۷/۱۲ نانومول بود.

#### ۴-۱۱-۴) تایید اتصال پروب تیوله بر سطح نانوذرات:

تجمع نانوپروپ و متعاقبا تغییر رنگ محلول آن از قرمز به طوسی به دلیل جدا شدن پروپ تیوله از سطح

نانوذرات در پی افزودن محلول DTT تاییدی بوجود پروپ بر سطح نانوذرات بود (شکل ۴-۹).



شکل ۴-۹) بررسی اتصال پروپ تیوله به سطح نانوذرات توسط DTT . (a) نانوپروپ (شاهد) (b) محلول نانوپروپ پس از افزودن (۱۶ میلی مول) DTT.

#### ۴-۱۱-۵) بهینه سازی روش تشخیصی:

پس انجام واکنش تکثیر باندهای ضعیفی با طول کمتر از ۱۰۰ جفت باز (مربوط به پرایمر-دایمر) بر روی ژل حضور داشتند که با خالص سازی محصول تکثیری حذف گردیدند.

#### ۴-۱۱-۵-۱) بررسی میزان پایداری نانوپروپ در برابر اثر القائی نمک منیزیم کلرید:

پایداری محلول تغلیظ شده ی نانوپروپ (۱۷/۱۲ نانومول) در برابر مقادیر مختلفی (۱/۷-۱ میکرولیتر) از محلول منیزیم کلراید (۰/۲ مولار) مورد بررسی قرار گرفت و کمترین مقدار از آن که منجر به القاء تجمع و تغییر رنگ نانوپروپ (از صورتی - طوسی) می شد، به عنوان حجم نهایی القاگر در فرآیند تشخیصی به کار

گرفته شد. این حجم برابر با ۱/۱ میکرولیتر و غلظت نهایی حدود ۱۶/۹ میلی مول درمحلول واکنش در حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر بود (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰) تاثیر حجم‌های مختلف محلول منیزیم کلراید ۰/۲ مولار بر روی نانوپروب (a) محلول شاهد (نانوپروب) (b-i) محلول نانوپروب پس افزودن منیزیم کلراید به ترتیب در حجم‌های ۱-۱/۷ میکرولیتر.

#### ۴-۱۱-۵) بهینه‌سازی روش تشخیصی بر روی محصول تکثیری:

در این آزمایش اساس تشخیص رنگ‌سنجی DNA باکتری مبنی بر ناپایداری نانوذرات طلا (القاء تجمع<sup>۱</sup> و تغییر رنگ نانوذرات) ناشی از مجاورت نمونه‌ی مورد آزمایش با عامل القاگر (نمک) بود. بدین ترتیب که در صورت عدم هیبریداسیون نانوپروب با توالی هدف مورد تشخیص، با افزودن القاگر نانوذرات مجتمع شده که به صورت تغییر رنگ (از قرمز به طوسی)، تغییرات طیف شامل پهن شدن پیک و جابه‌جایی طیف به طول موج‌های بالاتر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> Aggregation

<sup>۲</sup> Red shift

از ۵۲۴ نانومتر به ۶۵۰ نانومتر مشاهده گردید. آنالیز طیف‌ها در قالب تغییرات پارامترهایی نظیر: میزان جابه‌جایی طیف، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه<sup>۱</sup> (FWHM) و نیز نسبت جذب در دو طول موج<sup>۲</sup> (۵۲۴ / ۶۵۰ نانومتر) به منظور بررسی شدت تجمع و تغییر رنگ محلول صورت گرفت. مقدارنسبت ذکر شده رابطه‌ی مستقیمی با شدت تجمع و تغییر رنگ نانوذرات داشت به طوری که در تجمع و تغییر رنگ شدید به دلیل جابه‌جایی طیف به طول موج بالاتر و پهن شدن پیک، مقدار آن افزایش یافته بود. در این مطالعه به منظور بررسی توانایی نانوپروب در تشخیص DNA باکتری مورد نظر، پس از تعیین غلظت بهینه‌ی پروب (۰/۸۵ نانومول) بر روی نانوذرات از میان نمونه‌های سنتز شده، به منظور دستیابی به غلظتی از نانوپروب که ضمن تجمع در اثر القاء با کمترین غلظت الکترولیت، پایداری و حفظ رنگ مطلوبی را در حضور توالی هدف بعد از افزودن القاگر به دست می‌داد، ابتدا آزمایش هیبریداسیون محصول تکثیری با نانوپروب بهینه شده و پس از تایید صحت عملکرد روش ذکر شده، آزمایش جهت تعیین محدوده‌ی تشخیص DNA باکتری توسط این روش، در ۹ بازه‌ی غلظتی مختلف از توالی مورد نظر انجام شد. همچنین در هر سری از آزمایش‌ها قبل از شروع فرآیند تشخیصی، از کیفیت نانوپروب اطمینان حاصل گردید. تمام نتایج حاصل از آنالیز میانگین داده‌های سه بار تکرار آزمایش می‌باشند.

#### ۴-۱۱-۵) بررسی قابلیت نانوپروب در تشخیص DNA باکتری:

در روش تشخیصی حاضر هیبریداسیون نانوپروب (نانوذره‌ی کونژوگه با پروب تیوله) (جدول ۳-۱) مکمل با محصول تکثیری ژن اوره‌آز باکتری اوره‌آپلازما اوره‌آلیتیکوم صورت گرفته و پایداری نانوپروب در برابر تجمع ناشی از القای نمکی (منیزیم کلرید) در مقایسه با نمونه‌های کنترل بررسی گردید. برای این منظور آزمایش تشخیصی در ۹ بازه‌ی غلظتی مختلف (۶۰، ۵۵، ۵۰، ۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۰، ۱۵، ۱۰ نانوگرم) از محصول

<sup>۱</sup> Full width at half maximum (FWHM)

<sup>۲</sup> Aggregation ratio (650 nm/ 524 nm)

تکثیری اصلی و تخلیص شده، جهت تعیین کمترین مقداری که می توانست توسط نانوپروپ فوق شناسایی شود مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از قطعه‌ی ژنی nuoD به عنوان محصول غیرمرتبط، یک نمونه‌ی کنترل منفی (فاقد محصول تکثیری) و نیز محلول نانوپروپ به عنوان شاهد استفاده شد. فرآیند آزمایش در سه مرحله و با شرایط کاملاً یکسان تکرار و نتایج طیف سنجی نور مرئی به صورت نمودار پاسخ به غلظت آنالیت تفسیر شد و نتایج به صورت میانگین- انحراف معیار یافته‌های حاصل از سه بار تکرار آزمایش بیان گردید. نمودار پاسخ به غلظت (شکل ۴-۱۲) حاصل از طیف سنجی نور مرئی از جنبه‌های مختلف تغییرات موقعیت پیک پلاسمون، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه (FWHM) (جدول ۴-۱)، شدت تجمع نانوپروپ (نسبت شدت جذب در دو طول موج ۵۲۴ و ۶۵۰ نانومتر: ۶۵۰/۵۲۴) (شکل ۴-۱۳) و رنگ سنجی (شکل ۲-۱۱) به عنوان تابعی از غلظت محصول تکثیری، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آنالیز پارامترهای فوق برای تفسیر وضعیت نمونه‌ها استفاده گردید به طوری که برای نمونه‌ی کنترل منفی و محصول غیر مرتبط پارامترهای فوق به ترتیب میزان بالای جابه‌جایی پیک، کاهش شدید شدت جذب و نیز تغییر رنگ کامل (از قرمز به طوسی) نسبت به نانوپروپ را نشان دادند (به دلیل عدم هیبریداسیون با نانوپروپ)، این در حالی بود که همه‌ی ۹ غلظت از توالی هدف، رنگ را با نسبت‌های مختلفی حفظ کردند. محلول‌های حاوی محدوده‌های غلظتی ذکر شده یک کاهش بسیار جزئی در شدت پیک جذبی در حدود ۵۳۲ نانومتر نشان دادند. این کاهش شدت پیک جذبی در مورد کنترل منفی و محصول غیرمرتبط در طول موج‌های بالای ۶۰۰ نانومتر مشاهده شد (شکل ۲-۱۲). با وجود اینکه شدت تغییر این پارامترها در نمونه‌هایی در محدوده‌ی غلظتی ۳۰-۱۰ نانوگرم در مقایسه با کنترل منفی و محصول غیرمرتبط کمتر بود و تفاوت مشهودی از لحاظ تغییرات میزان جابه‌جایی پیک، کاهش شدت جذب و نیز تغییر رنگ بین دو مورد ذکر شده مشاهده می‌شد، ولی این تفاوت در نمونه‌هایی با محدوده‌ی غلظتی ۶۰-۳۵ نانوگرم، در قیاس با کنترل منفی چشمگیرتر می‌شد. آنالیز نتایج نسبت تجمع نانوذرات در دو طول موج ۶۵۰/۵۲۴

نانومتر بین شدت تجمع بیشتر محصول غیرمرتبط و کنترل منفی نسبت به نمونه‌های مثبت بود که صحت این نتایج در مورد کمترین غلظت استفاده شده در نمونه‌های مثبت (۱۰ نانوگرم) نیز به وضوح مشاهده می‌شد. به گونه‌ای که مقدار  $P < 0.0001$  در مقایسه‌ی میزان شدت تجمع، بین نمونه‌ی حاوی ۶۰ و ۱۰ نانوگرم از توالی هدف با کنترل منفی در هر دو مورد صدق می‌کرد در حالی که این مقدار برای نمونه‌ی ۱۰ نانوگرم در مقایسه با شاهد (نانوپروب) برابر با  $P = 0.974$  بود (شکل A ۱۳-۴). علاوه بر آن میزان جابه‌جایی پیک برای کنترل منفی و محصول غیرمرتبط به ترتیب برابر با ۱۱۷ و ۹۷ نانومتر و نیز دارای مقدار پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه (FWHM) برابر با ۱۴۷ و ۱۵۴ نانومتر بودند در حالی که این مقادیر در محدوده‌ی غلظتی ۳۰-۱۰ نانوگرم به ترتیب به حدود ۱۷ و ۷۵ نانومتر کاهش یافته بود جدول (۴-۱). مقادیر به دست آمده برای FWHM به وضوح نشان دهنده‌ی میزان تجمع بالای نانوپروب در محلول‌های واکنش کنترل منفی و نیز محصول غیر مرتبط بود به طوری که ناپایداری نانوپروب‌ها در این نمونه‌ها در برابر القای نمکی به دلیل عدم وقوع فرآیند هیبریداسیون، در نتیجه کاهش نیروی دافعه‌ی الکترواستریک بین نانوپروب‌ها باعث ایجاد مجتمع‌های نانوپروب در اندازه‌های مختلف شده که هریک موقعیت پیک جذبی متفاوتی در محدوده‌ی طیف نور مرئی تا فرابنفش به سمت طول موج‌های بالاتر برای خود اتخاذ کرده و منجر به افزایش پهنای پیک نمودار شده بود. میزان جابه‌جایی پیک در محدوده‌ی غلظتی ۶۰-۳۵ نانوگرم نسبت به پیک نانوپروب حدود ۸ نانومتر و پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه برای آن ۶۴ نانومتر بود. علاوه بر آن حفظ رنگ در بین این محدوده‌ی غلظتی نسبت به نانوپروب با شدت بیشتر و نسبتاً یکسانی مشاهده گردید. در حضور توالی DNA در محلول واکنش، هیبریداسیون اختصاصی آن با نانوپروب مکمل خود رخ داده و بار منفی حاصل از توالی دورشته‌ای شده، دافعه‌ی بین نانوذرات و متعاقباً پایداری آنها در برابر تجمع ناشی از افزودن القاگر نمکی را افزایش می‌داد. میزان این پایداری از یک روند وابسته به غلظت تبعیت می‌کرد با این وجود مقدار میزان جابه‌جایی پیک و FWHM بین نمونه‌های مثبت و کنترل دارای تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.0001$ ) بود در

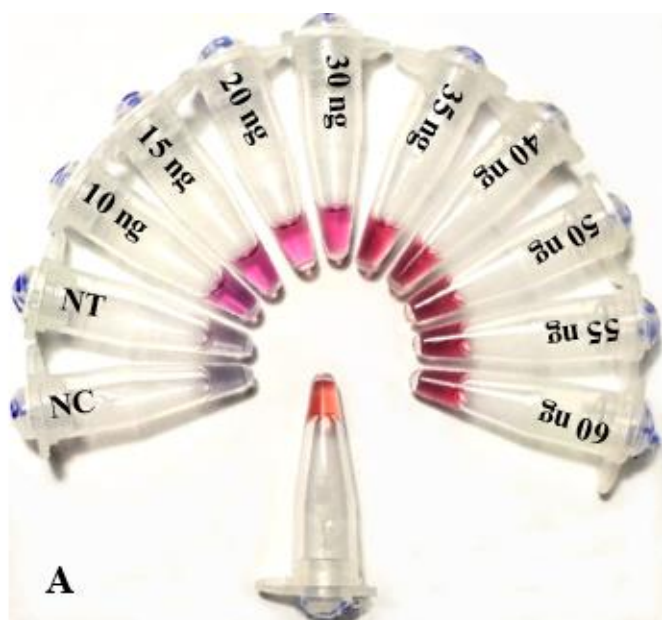


صورتی که این مقدار برای نمونه‌ی ۱۰ و ۶۰ نانوگرم نشان دهنده‌ی  $P > 0/05$  بود (شکل ۴-۱۳ b,c). شروع یک تغییر رنگ جزئی بین دو محدوده‌ی غلظتی از نمونه‌های مثبت از غلظت ۳۰ نانوگرم به پایین مشاهده شد. با این وجود اختلاف رنگ بین محصول غیرمرتبط و شیب غلظتی محصول (حتی در پایین‌ترین غلظت) به طور کامل به صورت چشمی قابل تفکیک بود (شکل ۴-۱۱). که این محدوده‌ی غلظتی نشان دهنده‌ی محدوده‌ی تشخیصی<sup>۱</sup> روش حاضر می‌باشد در واقع برای تمام غلظت‌های بالاتر از ۳۰ نانوگرم نتایج تغییر رنگ مشابه و ثابت بوده و از یک رفتار پلاتئو<sup>۲</sup> پیروی می‌کرد. به طور کلی نتایج حاصل از داده‌های طیف‌سنجی و نیز تفکیک رنگ بصری نمونه‌ها مبین موفقیت روش حاضر در تشخیص DNA باکتری در محدوده‌ی غلظتی ۱۰ نانوگرم بود.

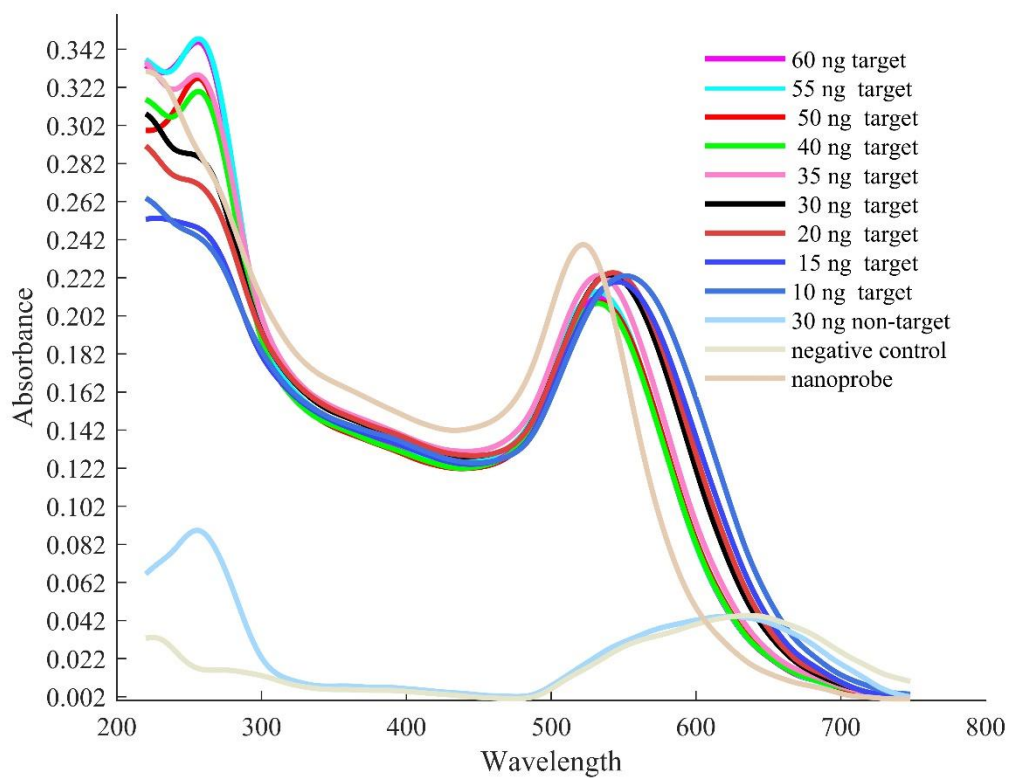
---

<sup>۱</sup> Dynamic range

<sup>۲</sup> Plateau



شکل ۴-۱۱) تصویر مربوط تغییر رنگ نمونه‌ها پس از افزودن القاگر (A). مقایسه‌ی رنگ شیب غلظتی نمونه‌ها با کنترل منفی (negative) (control-NC و محصول غیرمرتبط (non-target-NT) (B, C, D). به ترتیب نمای نزدیک از مقایسه‌ی رنگ نمونه‌ی ۶۰، ۳۰ و ۱۰ نانوگرم با NC، NT در حضور نانوپروپ.

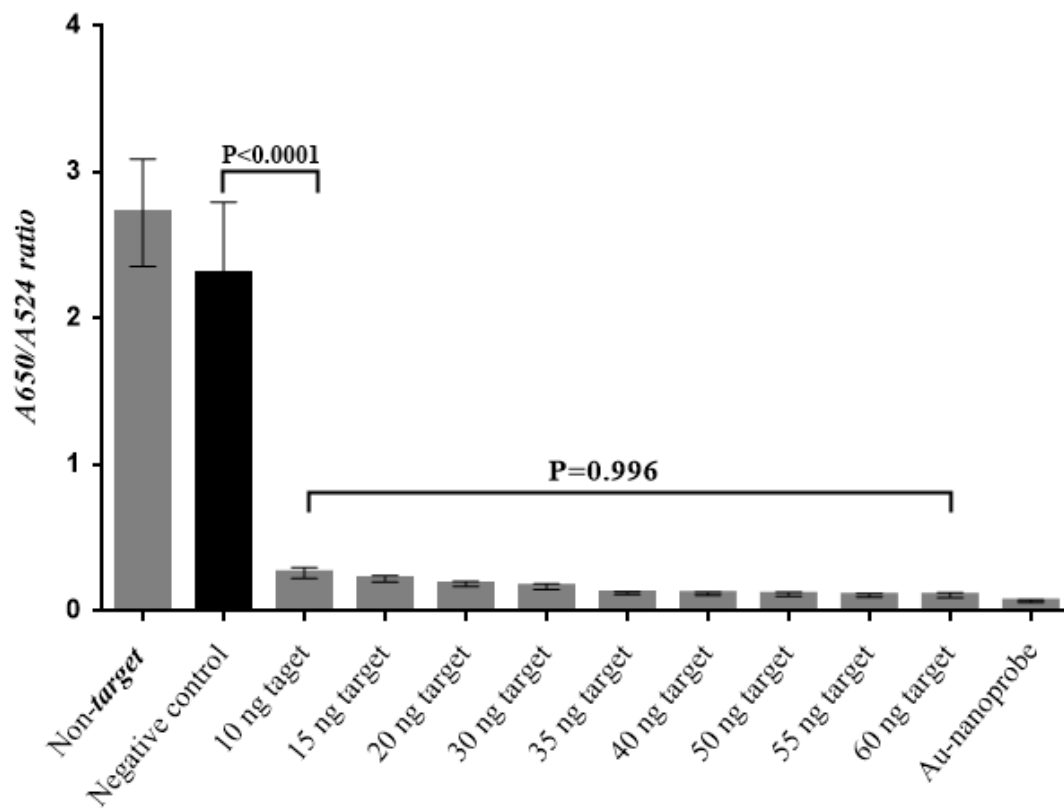


شکل ۴-۱۲) نمودار پاسخ به غلظت نمونه‌ها حاصل از آنالیز طیف سنجی توسط نانودراپ.

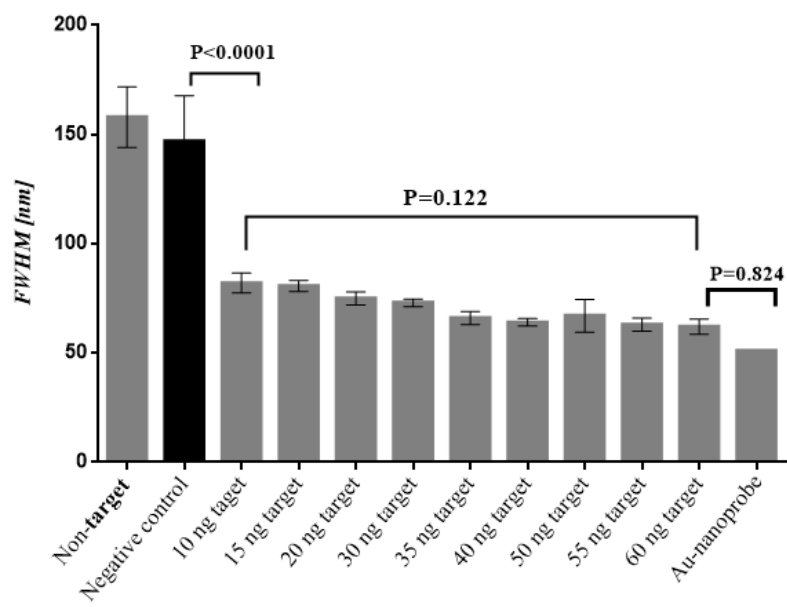
جدول ۴-۱) خصوصیات و تغییرات پیک پلاسمون نمونه‌ها، ارائه‌ی نتایج به صورت میانگین\_ انحراف معیار سه بار تکرار آزمایش.

نمونه‌ها	موقعیت پیک پلاسمون (nm)	شدت پیک	جابه‌جایی پیک نسبت به پیک پلاسمون نانوپروب (nm)	پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه (FWHM) (nm)
نانوپروب	۵۲۴	۰/۲۴۵	-----	۵۱
محصول تکثیری ۱۰ نانوگرم	۵۵۰	۰/۲۲۴	۲۲ ± ۳	۸۲ ± ۴
محصول تکثیری ۱۵ نانوگرم	۵۴۱	۰/۲۲۲	۱۷	۸۰ ± ۲
محصول تکثیری ۲۰ نانوگرم	۵۴۱	۰/۲۲۸	۱۵ ± ۱	۷۵ ± ۳
محصول تکثیری ۳۰ نانوگرم	۵۴۱	۰/۲۲۷	۱۶ ± ۴	۷۳ ± ۱
محصول تکثیری ۳۵ نانوگرم	۵۳۲	۰/۲۲۷	۱۰ ± ۲	۶۶ ± ۳
محصول تکثیری ۴۰ نانوگرم	۵۳۲	۰/۲۱۲	۱۰ ± ۲	۶۴ ± ۱
محصول تکثیری ۵۰ نانوگرم	۵۳۲	۰/۲۱۲	۹ ± ۲	۶۲ ± ۳
محصول تکثیری ۵۵ نانوگرم	۵۳۲	۰/۲۱۹	۸	۶۳ ± ۳
محصول تکثیری ۶۰ نانوگرم	۵۳۲	۰/۲۱۵	۸	۶۷ ± ۷
محصول تکثیری غیرمرتبط ۳۰ نانوگرم	۶۱۳	۰/۰۴۵	۹۷ ± ۱۱	۱۵۴ ± ۱۳
کنترل منفی	۶۲۸	۰/۰۴۷	۱۱۷ ± ۱۲	۱۴۷ ± ۲۰

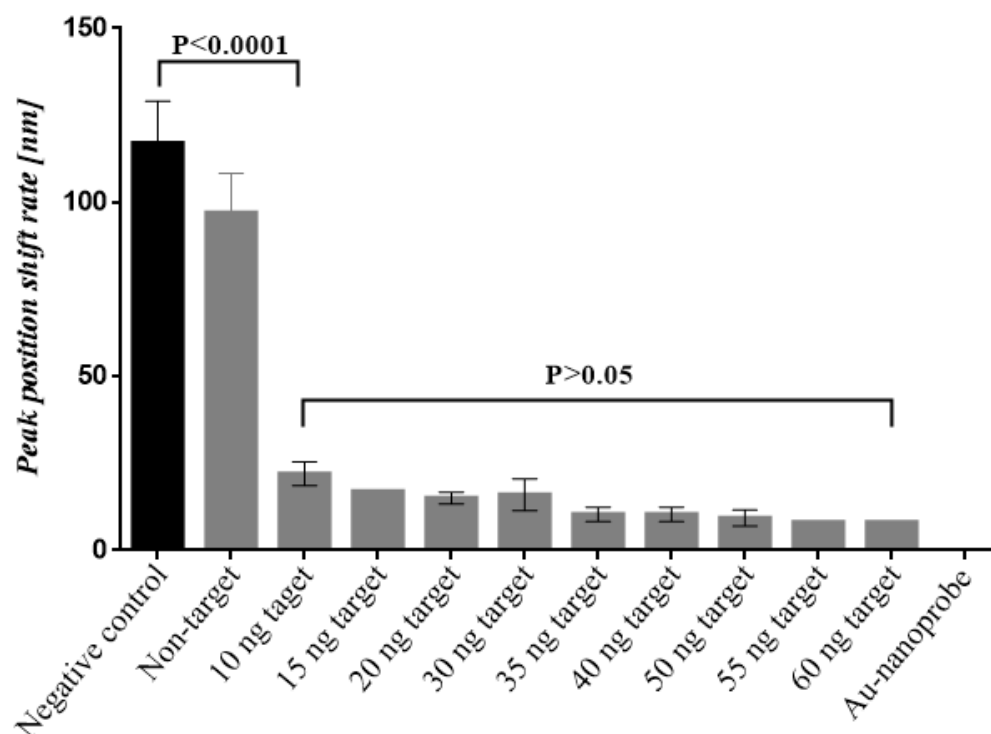
**A**



**B**



C



شکل ۴-۱۳) نتایج مربوط به آنالیز سطح معنی‌داری پارامترهای (A) شدت تجمع نانوپروب در نمونه‌ها (B) پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه و (C) میزان جابه‌جایی پیک پلاسمون نمونه‌ها نسبت به کنترل منفی و شاهد (نانوپروب)، جهت رسم نمودارها از میانگین داده‌های حاصل از سه بار تکرار مربوط به هر پارامتر آزمایش استفاده گردید.

## فصل پنجم

### بحث

نتیجه‌گیری، پیشنهادات و منابع

## فصل (۵) بحث و نتیجه گیری<sup>۱</sup>

### ۵-۱) بحث:

باکتری *اوره/پلازما/اوره/آلینیکوم* به عنوان شایع ترین مایکوپلاسمای تناسلی انسانی بیماری زا شناخته شده است و با طیفی از شرایط بالینی ارتباط دارد که مهم ترین آنها عبارتند از: ناباروری، سقط خودبه خودی، التهاب مجاری ادراری و بیماری های مزمن ریوی در نوزادان. روش های رایج موجود برای شناسایی این پاتوژن شامل کشت، تست های حساسیت آنتی بیوتیکی و روش های مولکولی PCR و real-time-PCR می باشند. زمانبر بودن، عدم اختصاصیت و حساسیت مطلوب برخی از این روش ها و نیز هزینه بالای روش های مولکولی، نیاز به توسعه ای یک روش تشخیصی ساده، سریع و کم هزینه با دقت تشخیصی مطلوب را می طلبد. در دهه های اخیر، ظهور نانوساختارها در طیف گسترده ای از زمینه های پزشکی از تشخیص تا درمان، امکان کاربرد آنها را در تشخیص مولکول های زیستی از جمله اسیدهای نوکلئیک (DNA, RNA)، پروتئین و کربوهیدرات ها فراهم کرده است (۱۴۴). در این میان نانوذرات فلزی خنثی با بهره مندی از ویژگی های نوری منحصر به فرد جایگاه ویژه ای در بین محققین علوم زیستی یافته اند (۱۴۵). از این رو نانوذرات طلا با توانایی تثبیت پایدار مولکول های زیستی عامل دار شده با تیول بر روی خود ضمن حفظ فعالیت زیستی آنها از تناسب ویژه ای جهت توسعه ای زیست حسگرها برخوردار هستند، همچنین سازگارپذیری زیستی و مقاومت در برابر اکسیداسیون از مزیت های دیگر این فلز به منظور کاربرد زیست پزشکی آن محسوب می شود (۱۴۶).

---

<sup>۱</sup> Discussion and conclusion



ویژگی عمده‌ی نانوذرات طلا که در توسعه‌ی حسگرهای زیستی از آن بهره گرفته شده است، خصوصیت زونانس پلاسمون سطحی متمرکز شده (LSPR)<sup>۱</sup> آنها می‌باشد که می‌تواند با تاثیرپذیری از تغییر در شکل، اندازه، اتصالات بین نانوذرات، ثابت دی الکتریک نانوذرات و نیز ثابت دی الکترک محیط اطراف آنها تحت کنترل قرار گیرد (۱۴۷).

دو نوع حسگر رایج که بر اساس تغییرات LSPR طراحی شده‌اند شامل ۱- حسگرهای حساس به تغییرات ضریب شکست، ۲- حسگرهای حساس به حالت های تجمعی نانوذرات می‌باشند (۱۴۸).

در مطالعه‌ی حاضر از روش رنگ سنجی مبتنی بر حساسیت طیف LSPR نسبت به تجمع نانوذرات طلا جهت تشخیص DNA باکتری بهره گرفته شده است. دو رویه‌ی تجمع نانوذرات طلا در روش رنگ سنجی شامل حالت تجمعی شبکه‌ای<sup>۲</sup> (CL) و حالت غیر شبکه‌ای<sup>۳</sup> (NCL) می‌باشند (۱۵۳). این روش‌ها تاکنون جهت شناسایی مولکول‌های مرتبط با طیف وسیعی از پاتوژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در روش CL مولکول مورد هدف تشخیصی (DNA and RNA) به عنوان رابط نزدیکی و تجمع بین دو نانوپروب مکمل خود عمل کرده و باعث تجمع نانوذرات می‌شود (۱۱۳، ۱۱۶، ۱۲۴). روش NCL از یک نانوپروب منفرد یا نانوذره‌ی فاقد پوشش جهت تشخیص بهره گرفته که تجمع و تغییر رنگ آن در پی افزودن یک عامل القاگر (عمدتا نمک) پس از شناسایی مولکول هدف صورت می‌گیرد (۱۰۱، ۱۲۲، ۱۳۳). در این مطالعه با در نظر گرفتن عدم نیاز روش NCL به کنترل دمایی در طی فرآیند هیبریداسیون نانوپروب با مولکول هدف و

<sup>۱</sup> Localized Surface Plasmon Resonance

<sup>۲</sup> Cross-linking (CL)

<sup>۳</sup> Non Cross-linking (NCL)

نیز کم هزینه بودن آن نسبت به روش CL، روش NCL جهت بهینه‌سازی تشخیص DNA باکتری مورد نظر به کار گرفته شد. به منظور افزایش موفقیت روش تشخیصی در شناسایی مولکول هدف عوامل ذیل در تحقیق حاضر مد نظر قرار گرفته شدند:

الف. اندازه و پراکندگی نانوذرات ساخته شده: در روش استفاده شده برای سنتز نانوذرات در این تحقیق (روش مبتنی بر سیترات سدیم)، اندازه‌ی نانوذرات ساخته شده با مقدار سیترات سدیم رابطه‌ی عکس دارد، بنابراین با انتخاب مقدار کنترل شده از سیترات سدیم روش سنتزی فوق ذراتی با اندازه‌ی کوچک و با توزیع یکنواخت (۱۴/۲۱ نانومتر) به دست داد (بخش ۴-۱۱-۳-۱ و بخش ۴-۱۱-۳-۲).

ب) بارگذاری پروب تیوله بر سطح نانوذرات طلا:

۱. تغییر اندازه‌ی نانوذرات پس از ساخت نانوپروب، تایید کننده‌ی بارگذاری پروب بر سطح نانوذرات بود (۱۵۴) به طوری که قطر هیدرودینامیکی نانوذرات از ۱۴/۲۱ نانومتر به ۱۹/۰۷ نانومتر افزایش یافته بود (بخش ۴-۱۱-۴-۱).

۲. آزادسازی پروب از سطح نانوذرات: تجمع و تغییر رنگ شدید نانوذرات از قرمز به طوسی به دلیل جدا شدن پروب از سطح آنها توسط DTT و متعاقباً اثر القایی غلظت بالای نمک سدیم کلرید موجود در بافر (۳۰۰ میلی مول) تاییدی بر موفقیت سنتز نانوپروب بود (بخش ۴-۱۱-۴-۲).

۳. بررسی ماکزیمم جذب: جابه جایی ماکزیمم جذب نانوپروب ۵۲۴ نانومتر نسبت به ماکزیمم جذب نانوذره قبل از بارگذاری (۵۲۰ نانومتر)، عامل تاییدی دیگری بر بارگذاری موفق پروب بر روی نانوذره بود (بخش ۴-۱۱-۴-۴).

پس از بررسی بارگذاری پروب بر سطح نانوذرات و تایید نتایج آزمایشات انجام شده که با مطالعه‌ی گروه *Storhoff et al.* همخوانی داشت (۱۵۵)، روش تشخیصی بر روی محصول تکثیری حاصل از حامل پلاسمیدی (بخش ۴-۱۱-۳) بهینه گردید. در مرحله‌ی اول جهت ممانعت از تداخل و حذف اجزای باقیمانده از فرآیند تکثیر مانند پرایمر-دایمراحتمالی، آنزیم DNA پلیمراز، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)<sup>۱</sup> و نمک‌های موجود در بافر به وسیله‌ی کیت خالص‌سازی مورد تخلیص قرار گرفت. تداخلات این عوامل به صورت ایجاد خطا در نتایج آزمایش از طریق جذب سطحی پرایمر (DNA تک رشته‌ای)، آنزیم پروتئینی و dNTPs بر روی نانوذرات می‌باشد که می‌تواند باعث افزایش مقاومت کاذب نانوپروب در برابر اثر القاگر شود (۱۵۵). در مرحله‌ی بعد، آزمایش بهینه‌سازی روش تشخیصی بر روی ۹ بازه‌ی غلظتی (۶۰- ۱۰ نانوگرم) از محصول تکثیری قطعه‌ی ژنی اوره‌آز، یک غلظت از قطعه‌ی ژنی (۳۰nougD نانوگرم) به عنوان محصول غیرمرتبط و یک نمونه‌ی فاقد محصول به عنوان کنترل منفی انجام شد برای این منظور ابتدا غلظت‌های ذکر شده از محصول تکثیری به همراه محصول غیرمرتبط و کنترل منفی با نانوپروب مجاور گردید (بخش ۱-۲-۷-۱۱-۴) و محلول واکنش‌ها جهت فرآیند دناتوراسیون DNA دو رشته‌ای در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد انکوبه شدند سپس با انکوباسیون نمونه‌ها در دمای اتاق شرایط لازم برای هیبریداسیون نانوپروب با قسمت مکمل خود از محصول تکثیری فراهم گردید. در پی افزودن القاگر، ممانعت الکترو استریک (ممانعت الکتریکی و فضایی) ایجاد شده ناشی از هیبریداسیون نانوپروب با توالی مکمل خود در نمونه‌های حاوی محصول هدف مانع از تجمع و تغییر رنگ آنها شد. با این وجود شیب جزئی از تفاوت رنگ بین غلظت‌های مختلف محصول هدف دیده می‌شد غلظت ۳۵ نانونوگرم و مقادیر بالاتر رنگ را با شدت بیشتر و یکسانی حفظ کرده بودند به طوری که هیچ تفاوت رنگی بین آنها مشاهده نمی‌شد ولی یک تغییر رنگ جزئی در ۳۰

<sup>۱</sup> deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP and dGTP)

نانوگرم و غلظت‌های پایین‌تر به دلیل مقدار نمونه‌ی کمتر و در نتیجه میزان هیبریداسیون پایین دیده می‌شد. درحالی که محلول واکنش حاوی محصول غیر مرتبط و کنترل منفی به محض افزودن القاگر تغییر رنگ فاحشی از قرمز به طوسی نشان دادند (شکل A-D ۴-۱۱). نتایج حاصل از شدت تجمع نانوذرات نیز تاییدی بر یافته‌های بصری رنگ سنجی بود. کنترل منفی و محصول غیرمرتبط دارای میزان تجمع بالایی بوده و سطح معنی‌داری ( $P < 0.0001$ ) آنها نسبت به نمونه‌های مثبت تفاوت چشمگیری داشت، همانطور که از نمودار شکل A ۴-۱۳ مشخص است کنترل منفی میزان تجمع کمتری در مقایسه با محصول غیرمرتبط نشان می‌دهد که این تفاوت به عدم وجود توالی DNA در محلول واکنش نسبت داده می‌شود بدین ترتیب که در صورت عدم وقوع واکنش هیبریداسیون حجم بیشتری از نانوپروب‌ها رسوب کرده و شدت تجمع آنها کمتر می‌شود در حالی که در نمونه‌ی غیر مرتبط بار منفی حاصل از حضورتوالی الیگونوکلوئوتیدی با ایجاد دافعه بین ذرات از رسوب آنها جلوگیری می‌کند. تفاوت شدت تجمع در بین نمونه‌های مثبت از روندی مشابه تغییرات رنگ پیروی کرده و یک تفاوت جزئی از غلظت ۳۰ نانوگرم به پایین‌تر در مقایسه با نانوپروب مشاهده می‌شد. مقدار FWHM نمونه‌ها در یک رابطه‌ی مستقیم با شدت تجمع (۱۵۶)، مبین افزایش چشمگیر پهنای پیک برای کنترل منفی (۱۴۷ نانومتر) و محصول غیرمرتبط (۱۵۴ نانومتر)، در مقایسه با کمترین غلظت از توالی هدف دارای FWHM برابر با ۸۲ نانومتر بود (جدول ۴-۱). در واقع با کاهش فاصله‌ی بین ذره‌ای و در نهایت تجمع آنها یک توزیع ناهمگونی از اندازه‌ی ذرات ایجاد شده و باعث افزایش پهنای پیک با کاهش غلظت آنالیت هدف می‌شد که این مورد به فرآیند افزایش حالت‌های چندگانه پلاسمون<sup>۱</sup> نسبت داده می‌شود (۱۵۷)، (۱۵۸). علاوه بر آن مقدار FWHM و میزان جابه‌جایی پیک نمونه‌های مثبت به طور معنی‌داری کمتر از کنترل منفی ( $P < 0.0001$ ) بود (شکل A-B ۴-۱۳) که ناشی از افزایش اندازه‌ی نانوذرات در اثر نزدیکی و

<sup>۱</sup> Multipolar plasmon modes

تجمع آنها به یکدیگر می‌باشد (۱۵۹) با توجه به تفسیرهای استنباط شده از آزمایشات انجام شده محدوده‌ی تشخیصی روش فوق در فاصله‌ی غلظتی بین ۳۰ تا ۱۰ نانوگرم و نیز پایین‌ترین غلظتی از توالی هدف که می‌توانست توسط آن شناسایی شود برابر با ۱۰ نانوگرم بود.

در ذیل تعدادی از مطالعاتی که از روش تشخیصی مشابه (NCL) بهره گرفته و نتایج آنها با یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر همخوانی داشت، ذکر گردیده است. تفاوت آنها با مطالعه‌ی ما تنها از نظر نوع مولکول تشخیصی و ماهیت القاگر می‌باشد.

۱. مطالعه‌ی انجام شده توسط گروه *Baptista et al.* در سال ۲۰۰۵ جهت شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (۱۰۹) دارای نتایج مشابه با مطالعه‌ی حاضر بود. به این صورت که با وقوع واکنش هیبریداسیون مکملی بین DNA هدف (محصول تکثیری حاصل از PCR) و پروب متصل به نانوذره‌ی طلا ممانعت فضایی و الکتریکی ایجاد شده و باعث پایداری نانوپروپ در برابر تجمع و تغییر رنگ ناشی از اثر القائی نمک می‌شد. پروب مورد استفاده‌ی آنها دارای طول ۱۵ جفت بازی و فاقد فاصله دهنده<sup>۱</sup> بود.

۲. در بررسی‌های انجام شده توسط *Eaton et al.* در سال ۲۰۰۷ از پروب ۱۵ نوکلئوتیدی و فاقد فاصله دهنده متصل به نانوذرات کروی طلا با قطر ۱۷ نانومتر برای شناسایی ژن بتاگلوبین استفاده شد (۱۱۰). در این مطالعه روش تشخیصی بر روی محصول PCR ژن بتاگلوبین با طول ۱۵۵۹ جفت باز حاصل از حامل پلاسمیدی سنتتیک انجام شده بود. در این کارآزمایی نیز در حضور مولکول هدف، نانوپروپ با آن هیبرید شده و DNA دو رشته‌ای شده در برابر اثر القاگر مقاومت کرده و رنگ قرمز خود را حفظ می‌کرد.

---

<sup>۱</sup> Spacer

۳. در مطالعه‌ی Padmavathy *et al.* در سال ۲۰۱۲ از روش NCL مبتنی بر نانوذرات کروی طلا برای شناسایی DNA ژنومی باکتری *E.coli* استفاده شده بود (۱۰۵). برای این منظور آنها یک پروب ۲۰ نوکلئوتیدی و بدون فاصله دهنده، مکمل توالی هدف را به کار گرفته بودند. القاگر مورد استفاده در این مطالعه هیدروکلریک اسید بود که هیبریداسیون توالی هدف-نانوپروب در برابر آن مقاومت نشان داده و مانع از تجمع نانوذرات می‌شد. کمترین مقدار از توالی هدف که در مطالعه‌ی آنها مورد شناسایی قرار گرفت برابر با ۵۴ نانوگرم بود در حالی که این مقدار برای مطالعه‌ی ما ۱۰ نانوگرم بود. این تفاوت در توانایی تشخیص به دلیل انجام روش تشخیصی آنها بر روی ژنوم تکثیر نشده باکتری بود در مقابل استفاده از محصول PCR تکثیر شده با پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ی ژنی مربوط به باکتری UU در مطالعه‌ی حاضر منجر به افزایش دقت تشخیص روش فوق شد.

۴. مطالعه‌ی Margarita *et al.* در سال ۲۰۱۳ در یک روش غیرشبکه‌ای برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا انجام شد (۱۱۷). آنها از از چهار نوع پروب مختلف اختصاصی نواحی ژنومی حفظ شده بین گونه‌های لیشمانیا استفاده کرده بودند که در نهایت موفق به شناسایی توالی ژنومی با اختصاصیت و حساسیت بالا شدند.

۵. در مطالعه‌ی Wai-Sing Chan *et al.* در سال ۲۰۱۴ از یک پروب ۲۰ نوکلئوتیدی فاقد فاصله دهنده متصل به نانوذرات طلا برای شناسایی محصول PCR توالی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین حاصل از نمونه‌های بالینی استفاده گردید (۱۲۲). در آزمایش آنها دو نوع پروب اختصاصی نواحی ژنی 23S *mecA* and *rRNA* به کار گرفته شده بود. نتایج آنها نشان دهنده‌ی اهمیت بالای موقعیت اتصال پروب بر روی توالی هدف در حساسیت روش حاضر بود به گونه‌ای که اتصال پروب فارغ از نوع آن، به یک قسمت داخلی و نزدیک به انتهای 5' توالی هدف و در نتیجه آزاد ماندن بخش عمده‌ای از توالی مورد نظر حساسیت

روش تشخیصی را به میزان بالایی نسبت به حالتی که پروب به ناحیه‌ی دورتری از انتهای □ 5 مولکول هدف متصل می‌شد، افزایش می‌داد این مورد به ممانعت فضایی ناشی از انتهای آزاد توالی تک رشته‌ای نسبت داده می‌شود.

۶. شناسایی پلاسمودیوم ویواکس (عامل مالاریای انسانی) توسط Yossf Alnasser *et al.* در سال ۲۰۱۶ دارای نتایجی مشابه با مطالعه‌ی حاضر بود (۱۲۸). در حضور توالی هدف و اتصال آن با نانوپروب، ممانعت فضایی ایجاد شده بین نانوذرات باعث حفظ آنها در حالت پراکنده پس از افزودن القاگر (NaCl) شده و در نتیجه مانع تجمع و تغییر رنگ آنها می‌شد.

۷. در مطالعه‌ی Sherrif m *et al.* در سال ۲۰۱۷ جهت شناسایی RNA ویروس هپاتیت C از نانوذرات کاتیونی Cysteamine به عنوان القاگر تجمع نانوذرات طلا استفاده شد (۱۳۰). در آزمایش آنها نیز در یک روند مشابه، در صورت عدم حضور توالی هدف نانوپروب، با افزودن القاگر (نانوذرات کاتیونی) نزدیکی و تجمع بین نانوذرات طلا و نانوذرات کاتیونی رخ داده و تغییر رنگ محلول (از قرمز به بنفش) مشاهده می‌شد. ولی در صورت حضور توالی هدف، اتصال آن با نانوپروب مانع از برخورد بین نانوذرات طلا و ذرات القاگر شده و رنگ محلول واکنش (قرمز) حفظ می‌شد.

۸. مطالعه‌ی Amy *et al.* در سال ۲۰۱۸ برای شناسایی DNA یک پاتوژن گیاهی به صورت مقایسه‌ای، بین نانوذرات طلا سیترا ته و و نانوذرات طلا پوشیده شده با دکسترین<sup>۱</sup> انجام شده بود (۱۳۵). نتایج آنها نشان دهنده‌ی پایداری بیشتر نانوذرات پوشیده شده با دکسترین در غلظت بالای NaCl در مقایسه با نانوذرات

---

<sup>۱</sup>Dextrin (d-AuNPs)

سیتراته بود. ولی در حضور توالی ژنومیک هدف و هیبریداسیون آن با پروب اختصاصی هر دو نوع نانوذره فارغ از ماهیت شیمی سطح، از پایداری یکسانی برخوردار بودند.

۹. مطالعه‌ی Sato *et al.* در سال ۲۰۰۳ تنها مطالعه‌ای بود که با استفاده از روش تشخیصی مشابه با مطالعه‌ی حاضر، نتایجی مخالف با آن را به دست داده بود (۱۰۱). در مطالعه‌ی آنها که اقدام به شناسایی SNP کرده بودند، در صورت اتصال کامل نانوپروب به توالی هدف، در پی افزودن القاگر نانوذرات مجتمع شده و تغییر رنگ از قرمز به آبی-ارغوانی مشاهده می‌شد در حالی که هیبریداسیون ناقص نانوپروب با توالی حاوی SNP مانع تجمع نانوذرات در برابر اثر القائی الکترولیت شده و رنگ محلول (قرمز) حفظ می‌شد. پروب مورد استفاده‌ی آنها دارای طولی برابر با ۱۵ نوکلئوتید، فاقد فاصله دهنده و هم اندازه با توالی مولکول هدف سنتتیک بود که عامل تفاوت بین نتایج مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های آنها بود. به طور معمول نانوذرات طلا با برقراری پیوند الکترواستاتیک با گروه آمین پروب الیگونوکلئوتیدی از طریق بار منفی سیترات موجود در سطح خود در برابر اثر القاگر مقاومت می‌کند این پایداری از اثر هم‌افزای ممانعت فضایی و بار منفی فسفات پروب (ممانعت الکترواستریک) و نیز جذب سطحی آن به نانوذره ناشی می‌شود (۱۶۰). از طرف دیگر هیبریداسیون مولکول هدف با نانوپروب، با کاهش جذب سطحی پروب، تشکیل ساختار دو رشته‌ای و انعطاف ناپذیر DNA به همراه کاهش بار منفی فسفات DNA توسط یون‌های مثبت الکترولیت (۱۶۱) منجر به ناپایداری و تجمع نانوذرات پس از افزودن نمک می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر مولکول هدف دو رشته‌ای دارای طولی برابر ۳۷۸ جفت باز بود که پس از تک رشته‌ای شدن و هیبریداسیون با نانوپروب ۲۹ نوکلئوتیدی بخش زیادی از توالی آن به صورت تک رشته‌ای باقی مانده و با ایجاد ممانعت الکترواستریک باعث پایداری نانوپروب در برابر اثر القائی نمک می‌شد ولی فقدان توالی هدف در محلول واکنش منجر به ناپایداری نانوپروب در پی افزودن القاگر می‌شد.



## ۵-۲) نتیجه‌گیری:

در مطالعه‌ی حاضر شناسایی DNA باکتری اوره‌آپلازما و اوره‌آل‌تیکوم با استفاده از نانوپروب طلا در یک روش رنگ سنجی برای اولین بار به طور موفقیت آمیز انجام گردید.

نتایج حاصل از بررسی روش تشخیصی در محدوده‌ی غلظتی ۶۰-۱۰ نانوگرم از محصول تکثیری نشان دهنده‌ی محدوده‌ی تشخیصی ۱۰ نانوگرم برای روش حاضر بود که در راستای فرضیه‌ی ارائه شده در ابتدای مطالعه، مبنی بر توانایی روش فوق در تشخیص DNA باکتری بود.

## ۵-۳) پیشنهادات:

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق فوق و نیز تعدیلات انجام شده در مطالعات اخیر بر روی روش تشخیصی حاضر پیشنهادات ذیل جهت بهبود روش تشخیصی می‌توانند ارائه شوند:

۱) انجام روش تشخیصی به طور مستقیم بر روی DNA نمونه‌های بالینی بدون به کارگیری PCR.

۲- به حداقل رساندن تجهیزات مورد نیاز برای تشخیص و زمان روش تشخیصی با استفاده از فرآیند تکثیر

هم دمای وابسته به ریکامیناز<sup>۱</sup> (RPA) به جای واکنش PCR با چرخه‌های دمایی متعدد، جهت تکثیر توالی هدف.

۳) توسعه‌ی روش حاضر در قالب کیت تشخیصی به صورت میکروچیپ و یا استریپ تست.

---

<sup>۱</sup> Recombinase polymerase amplification

## References:

1. Kokkayil P, Dhawan B. Ureaplasma: current perspectives. Indian journal of medical microbiology. 2015;33(2):205.
2. Viscardi RM. Ureaplasma species: role in neonatal morbidities and outcomes. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition.2014;99(1).F87-F92.
3. Irajian G, Sharifi M, Mirkalantari S, Mirnejad R. Molecular Detection of Ureaplasma urealyticum from Prostate Tissues using PCR-RFLP, Tehran, Iran. Iranian Journal of Pathology. 2016;11(2):138-43.
4. Waites KB, Xiao L, Paralanov V ,Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of Mycoplasma and ureaplasma infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. The Journal of Molecular Diagnostics. 2012;14(5):437-50.
5. Vancutsem E, Soetens O, Breugelmans M, Foulon W, Naessens A. Modified real-time PCR for detecting, differentiating, and quantifying Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum. The Journal of Molecular Diagnostics. 2011;13(2):206-12.
6. Seifoleslami M, Safari A, Khameneie MK. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in High Vaginal Swab Samples of Infertile Females. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2015;17(12).
7. Ahmadi A, Khodabandehloo M, Ramazanzadeh R, Farhadifar F, Nikkhoo B, Soofizade N, et al. Association between Ureaplasma urealyticum endocervical infection and spontaneous abortion. Iranian journal of microbiology. 2014;6(6):392.
8. Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. Frequency of Chlamydia trachomatis in Ureaplasma-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. BMC infectious diseases. 2012;12(1):1.
9. Samra Z, Rosenberg S, Madar-Shapiro L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2011;70(1):17-21.
10. Jones JA, Chaban N, May M. Global Rates and Prevalence of Urogenital Mycoplasmosis: Assembly of a Dataset from Peer-Reviewed Literature. Open Journal of Medical Microbiology. 2013;3(02):105.
11. Zeighami H, Peerayeh S, Yazdi R, Sorouri R. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in semen of infertile and healthy men. International journal of STD & AIDS. 2009;20(6):387-90.

12. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Ureaplasma parvum lipoproteins, including MB antigen, activate NF- $\kappa$ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology*. 2008;154(5):1318-25.
13. Kacerovsky M, Celec P, Vlkova B, Skogstrand K, Hougaard DM, Cobo T, et al. Amniotic fluid protein profiles of intraamniotic inflammatory response to Ureaplasma spp. and other bacteria. *PloS one*. 2013;8(3):e60399.
14. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):757-89.
15. Zhang Q, Xiao Y, Zhuang W, Cheng B, Zheng L, Cai Y, et al. Effects of biovar I and biovar II of Ureaplasma urealyticum on sperm parameters, lipid peroxidation, and deoxyribonucleic acid damage in male infertility. *Urology*. 2014;84(1):87-92.
16. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, et al. Ureaplasma urealyticum is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: a case-control study. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(8):1274-82.
17. Taylor-Robinson D. Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. *Clinical infectious diseases*. 1996;671-82.
18. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(4):1094-156.
19. Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, Faye-Petersen O, Cliver SP, Carlo WA, et al. The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;198(1):43. e1-. e5.
20. Robinson JW, Dando SJ, Nitsos I, Newnham J, Polglase GR, Kallapur SG, et al. Ureaplasma parvum serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. *PloS one*. 2013;8(4):62746.
21. Cultrera R, Seraceni S, Germani R, Contini C. Molecular evidence of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC infectious diseases*. 2006;6(1):1.
22. Pandey A, Dhawan B, Gupta V, Chaudhry R, Deorari A. Clinical significance of airways colonization with Ureaplasma urealyticum in premature (< 34 wk) neonates. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(5):679.
23. Pacifico L, Panero A, Roggini M, Rossi N, Bucci G, Chiesa C. Ureaplasma urealyticum and pulmonary outcome in a neonatal intensive care population. *The Pediatric infectious disease journal*. 1997;16(5):86-579.
24. Bry K, Hogmalm A, Bäckström E, editors. Mechanisms of inflammatory lung injury in the neonate: lessons from a transgenic mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in perinatology*; 2010: Elsevier.

25. Cassell G, Waites K, Watson H, Crouse D, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clinical microbiology reviews*. 1993;6(1):69-87.
26. Ekiel A, Pietrzak B, Wiechula B, Aptekorz M, Mazanowska N, Rady D, et al. Urogenital Mycoplasmas and Human Papilloma Virus in Hemodialysed Women. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
27. Ahmadi MH, Mirsalehian A, Bahador A. Prevalence of Urogenital Mycoplasmas in Iran and Their Effects on Fertility Potential: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian journal of public health*. 2016;45(4):409.
28. Murdaca G, Russo R, Spanò F, Ferone D, Albertelli M, Schenone A, et al. Autoimmune central diabetes insipidus in a patient with *ureaplasma urealyticum* infection and review on new triggers of immune response. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2015;59(6):554-8.
29. McIver C, Rismanto N, Smith C. Multiplex PCR testing detected higher than expected rates of cervical Mycoplasmas, Ureaplasmas, Trichomonas and viral Agents in sexually active Australian women. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1358-63.
30. Taylor-Robinson D, Bebear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1997;40(5):622-30.
31. Phillips I, Dimian C, Barlow D, Moi H, Stolz E, Weidner W, et al. A comparative study of two different regimens of sparfloxacin versus doxycycline in the treatment of non-gonococcal urethritis in men. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1996;37(suppl\_A):123-34.
32. Ballard HO, Shook LA, Bernard P, Anstead MI, Kuhn R, Whitehead V, et al. Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Pediatric pulmonology*. 2011;46(2):11-18.
33. Dhawan B, Malhotra N, Sreenivas V, Rawre J, Khanna N, Chaudhry R, et al. *Ureaplasma* serovars & their antimicrobial susceptibility in patients of infertility & genital tract infections. *The Indian journal of medical research*. 2012;136(6):991.
34. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. *BMC infectious diseases*. 2013;13(1):453.
35. Waites KB, Duffy LB, Bébéar CM, Matlow A, Talkington DF, Kenny GE, et al. Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of clinical microbiology*. 2012;JCM. 01439-12.
36. Deodhar L, Sonawala M, Gogate A. Co-existence of *N. gonorrhoeae* and *U. urealyticum* in male urethra. *Journal of postgraduate medicine*. 1989;35(3):144.

37. Waites KB, Figarola TA, Schmid T, Crabb DM, Duffy LB, Simecka JW. Comparison of agar versus broth dilution techniques for determining antibiotic susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1991;14(3):265-71.
38. Yoon BH, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;189(4):919-24.
39. Xu C, Zhang N, Huo Q, Chen M, Wang R, Liu Z, et al. Polymerase chain reaction–hybridization method using urease gene sequences for high-throughput *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* detection and differentiation. *Analytical biochemistry*. 2016;499:57-62.
40. Zdrojewicz Z, Waracki M, Bugaj B, Pypno D, Cabala K. Medical applications of nanotechnology. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*. 2015;69.
41. Martz E. Enough is enough! Handling multicollinearity in regression analysis. Retrieved. 2013;6(14):2014.
42. Torres-Sangiao E, Holban AM, Gestal MC. Advanced nanobiomaterials: vaccines, diagnosis and treatment of infectious diseases. *Molecules*. 2016;21(7):867.
43. Neto LMM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Role of metallic nanoparticles in vaccinology: Implications for infectious disease vaccine development. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
44. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical reviews*. 2005;105(4):1547-62.
45. Sáez V, Mason TJ. Sonoelectrochemical synthesis of nanoparticles. *Molecules*. 2009;14(10):4284-99.
46. Agasti SS, Rana S, Park M-H, Kim CK, You C-C, Rotello VM. Nanoparticles for detection and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(3):316-28.
47. Hill EK, Li J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of animal science and biotechnology*. 2017;8(1):26.
48. Santhoshkumar J, Rajeshkumar S, Kumar SV. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles—A review. *Biochemistry and biophysics reports*. 2017;11:46-57.
49. Ramos AP, Cruz MA, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical reviews*. 2017:1-11.
50. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(11):3835-53.
51. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *ACS Publications*; 2003.

52. Link S, El-Sayed MA. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. ACS Publications; 1999.
53. Dwivedi A, Vyas O. Wireless sensor network: At a glance. Recent Advances in Wireless Communications and Networks: InTech; 2011.
54. Huang Y, Fan C-Q, Dong H, Wang S-M, Yang X-C, Yang S-M. Current applications and future prospects of nanomaterials in tumor therapy. International Journal of Nanomedicine. 2017;12:1815.
55. Cordeiro M, Ferreira Carlos F, Pedrosa P ,Lopez A, Baptista PV. Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care. Diagnostics. 2016;6(4):43.
56. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. J Phys Chem B. 2006;110(14):7238-48.
57. Cao J, Sun T, Grattan KT. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. Sensors and actuators B: Chemical. 2014;51-195:332.
58. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. Journal of advanced research. 2010;1(1):13-28.
59. Pors A, Nielsen MG, Bernardin T, Weeber J-C, Bozhevolnyi SI. Efficient unidirectional polarization-controlled excitation of surface plasmon polaritons. Light: Science & Applications. 2014;3(8):e197.
60. Kik PG, Brongersma ML. Surface plasmon nanophotonics. Surface Plasmon Nanophotonics: Springer; 2007. p. 1-9.
61. Zou C, Withayachumnankul W, Shadrivov IV, Kivshar YS, Fumeaux C. Directional excitation of surface plasmons by dielectric resonators. Physical Review B. 2015;91(8):085433.
62. Derkachova A, Kolwas K, Demchenko I. Dielectric Function for Gold in Plasmonics Applications: Size Dependence of Plasmon Resonance Frequencies and Damping Rates for Nanospheres. Plasmonics. 2016;11(3):941-51.
63. Fan X, Zheng W, Singh DJ. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles. Light: Science & Applications. 2014;3(6):e179.
64. Esfahani MR, Pallem VL, Stretz HA, Wells MJ. Extinction, emission, and scattering spectroscopy of 5–50 nm citrate-coated gold nanoparticles: An argument for curvature effects on aggregation. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017;175:100-9.
65. Popescu RC, Fufă MOM, Grumezescu AM. Metal-based nanosystems for diagnosis. Rom J Morphol Embryol. 2015;56(2 Suppl):635-49.

66. Sriram M, Zong K, Vivekchand S, Gooding JJ. Single nanoparticle plasmonic sensors. *Sensors*. 2015;15(10):25774-92.
67. Altunbek M, Kuku G, Culha M. Gold Nanoparticles in Single-Cell Analysis for Surface Enhanced Raman Scattering. *Molecules*. 2016;21(12):1617.
68. Lim M-C, Kim Y-R. Analytical Applications of Nanomaterials in Monitoring Biological and Chemical Contaminants in Food. *J Microbiol Biotechnol*. 2016;26:1505-16.
69. Alsawafta M. Optical properties of metallic nanoparticles and metallic nanocomposite materials: Concordia University; 2012.
70. Dahmen C, Schmidt B, von Plessen G. Radiation damping in metal nanoparticle pairs. *Nano letters*. 2007;7(2):318-22.
71. Ristig S, Prymak O, Loza K, Gocyla M, Meyer-Zaika W, Heggen M, et al. Nanostructure of wet-chemically prepared, polymer-stabilized silver–gold nanoalloys (6 nm) over the entire composition range. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(23):4654-62.
72. Willets KA, Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem*. 2007;58:267-97.
73. Lee K-S, El-Sayed MA. Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109(43):20331-8.
74. Lee K-S, El-Sayed MA. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(39):19220-5.
75. Roy P, Dhara K, Manassero M, Banerjee P. A new organic compound for the synthesis of gold nanoparticles. *Polyhedron*. 2008;27(14):3085-90.
76. Rodríguez-Lorenzo L, De La Rica R, Álvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM, Stevens MM. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nature materials*. 2012;11(7):604-90.
77. Van Der Pol E, Coumans FA, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis. *Nano letters*. 2014;14(11):6195-201.
78. Howes PD, Chandrawati R, Stevens MM. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. *Science*. 2014;346(6205):1247390.
79. Pihíková D, Kasák P, Tkac J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open chemistry*. 2015;13(1).

80. Yuan L-F, He Y-J, Zhao H, Zhou Y, Gu P. Colorimetric detection of D-amino acids based on anti-aggregation of gold nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*. 2014;25(7):995-1000.
81. Wuithschick M, Birnbaum A, Witte S, Sztucki M, Vainio U, Pinna N, et al. Turkevich in new robes: key questions answered for the most common gold nanoparticle synthesis. *ACS nano*. 2015;9(7):7052-71.
82. Park J-W, Shumaker-Parry JS. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(5):1907-21.
83. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch S. *Fundamentals of analytical chemistry*: Nelson Education; 2013.
84. Ruiz-Cabello FJM, Trefalt G, Maroni P, Borkovec M. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Physical Review E*. 2014;90(1):012301.
85. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016;235:337-51.
86. Perera GS, Yang G, Nettles CB, Perez F, Hollis TK, Zhang D. Counterion Effects on Electrolyte Interactions with Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016;120(41):23604-12.
87. Blachechen LS, Silva JO, Barbosa LR, Itri R, Petri DF. Hofmeister effects on the colloidal stability of poly (ethylene glycol)-decorated nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. 2012;290(15):1537-46.
88. Kunz W, Henle J, Ninham BW. ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’(about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2004;9(1):19-37.
89. Louie SM, Tilton RD, Lowry GV. Effects of molecular weight distribution and chemical properties of natural organic matter on gold nanoparticle aggregation. *Environmental science & technology*. 2013;47(9):4245-54.
90. Yeshchenko O, Bondarchuk I, Gurin V, Dmitruk I, Kotko A. Temperature dependence of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles. *Surface Science*. 2013;2013:81-608:275.
91. Peng C, Zhang W, Gao H, Li Y, Tong X, Li K, et al. Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials*. 2017;7(1):21.
92. He YT, Wan J, Tokunaga T. Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of nanoparticle research*. 2008;10(2):321-32.



93. Hormozi-Nezhad M, Seyedhosseini E, Robatjazi H. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles. *Scientia Iranica*. 2012;19(3):958-63.
94. Bahram M, Hoseinzadeh F, Farhadi K, Saadat M, Najafi-Moghaddam P, Afkhami A. Synthesis of gold nanoparticles using pH-sensitive hydrogel and its application for colorimetric determination of acetaminophen, ascorbic acid and folic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;441:517-24.
95. Krutyakov YA, Kudrinskiy AA, Zharebin PM, Yapryntsev AD, Pobedinskaya MA, Elansky SN, et al. Tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens. *Materials Research Express*. 2016;3(7):075403.
96. Carl N, Prévost S, Fitzgerald JP, Karg M. Salt-induced cluster formation of gold nanoparticles followed by stopped-flow SAXS, DLS and extinction spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017;19(25):16348-57.
97. Li N, Yu L, Zou J. Critical coagulation concentration-based salt titration for visual quantification in gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Journal of laboratory automation*. 2014;19(1):82-90.
98. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*. 1997;277(5329):1078-81.
99. Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*. 2008;9(15):2363-71.
100. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11:55-75.
101. Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(27):8102-3.
102. Wang J, Wu ZL, Zhang HZ, Li YF, Huang CZ. Selective colorimetric analysis of spermine based on the cross-linking aggregation of gold nanoparticles chain assembly. *Talanta*. 2017;167:193-200.
103. Wang G, Akiyama Y, Shiraishi S, Kanayama N, Takarada T, Maeda M. Cross-linking versus non-cross-linking aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization: A comparison of the rapidity of solution color change. *Bioconjugate chemistry*. 2016;28(1):27.
104. Thaxton CS, Georganopoulou DG, Mirkin CA. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*. 2006;363(1-2):120-6.

105. Bakthavathsalam P, Rajendran VK, Mohammed JAB. A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of nanobiotechnology*. 2012;10(1):8.
106. Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(39):14036-9.
107. Li H, Rothberg LJ. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(35):10958-61.
108. Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions. *Nucleic acids research*. 2005;33(1):e4-e.
109. Baptista PV, Koziol-Montewka M, Paluch-Oles J, Doria G, Franco R. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clinical chemistry*. 2006;52(7):1433-4.
110. Eaton P, Doria G, Pereira E, Baptista PV, Franco R. Imaging gold nanoparticles for DNA sequence recognition in biomedical applications. *IEEE Transactions on nanobioscience*. 2007;6(4):282-8.
111. Doria G, Franco R, Baptista P. Nanodiagnostics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. *Iet Nanobiotechnology*. 2007;1(4):53-7.
112. Chen Y-T, Hsu C-L, Hou S-Y. Detection of single-nucleotide polymorphisms using gold nanoparticles and single-strand-specific nucleases. *Analytical biochemistry*. 2008;375(2):299-305.
113. Javier DJ, Castellanos-Gonzalez A, Weigum SE, White AC, Richards-Kortum R. Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* heat shock protein 70 mRNA. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(12):4060-6.
114. Jung YL, Jung C, Parab H, Li T, Park HG. Direct colorimetric diagnosis of pathogen infections by utilizing thiol-labeled PCR primers and unmodified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;25(8):1941-6.
115. Jung C, Chung JW, Kim UO, Kim MH, Park HG. Real-time colorimetric detection of target DNA using isothermal target and signaling probe amplification and gold nanoparticle cross-linking assay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;26(5):1953-8.
116. Oh J-H, Lee J-S. Designed hybridization properties of DNA-gold nanoparticle conjugates for the ultrasensitive detection of a single-base mutation in the breast cancer gene BRCA1. *Analytical chemistry*. 2011;83(19):7364-70.
117. Andreadou M, Liandris E, Gazouli M, Taka S, Antoniou M, Theodoropoulos G, et al. A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles. *Journal of microbiological methods*. 2014;96:56-61.

118. Tsai T-T, Shen S-W, Cheng C-M, Chen C-F. based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles. *Science and technology of advanced materials*. 2013;14(4):044404.
119. Ahmadpour-Yazdi H, Hormozi-Nezhad MR, Abadi AR, Sanati MH, Kazemi B. Colourimetric-based method for the diagnosis of spinal muscular atrophy using gold nanoprobe. *IET nanobiotechnology*. 2014;9(1):5-10.
120. Ahmadpour-Yazdi H. Mutation Detection of Spinal Muscular Atrophy by a Colorimetric Method which Uses Gold Nanoparticles [Ph.D. degree]. Tehran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences; 2013.
121. Carlos FF, Flores O, Doria G, Baptista PV. Characterization of genomic single nucleotide polymorphism via colorimetric detection using a single gold nanoprobe. *Analytical biochemistry*. 2014;465:1-5.
122. Chan W-S, Tang BS, Boost MV, Chow C, Leung PH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a gold nanoparticle-based colourimetric polymerase chain reaction assay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;53:105-11.
123. Veigas B, Pedrosa P, Carlos FF, Mancio-Silva L, Grosso AR, Fortunato E, et al. One nanoprobe, two pathogens: gold nanoprobe multiplexing for point-of-care. *Journal of nanobiotechnology*. 2015;13(1):48.
124. Rajendran P, Kaufmann S, Vörös J, Zenobi-Wong M, Demkó L. Femtomolar oligonucleotide detection by a one-step gold nanoparticle-based assay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;135:200-193.
125. Saleh M, El-Matbouli M. Rapid detection of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) using a gold nanoparticle-based hybridization assay. *Journal of virological methods*. 2015;217:50-4.
126. Li R-D, Yin B-C, Ye B-C. Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;86:1011-6.
127. Gao X, Tsou Y-H, Garis M, Huang H, Xu X. Highly specific colorimetric detection of DNA oxidation biomarker using gold nanoparticle/triplex DNA conjugates. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016;12(7):2101-5.
128. Alnasser Y, Ferradas C, Clark T, Calderon M, Gurbillon A, Gamboa D, et al. Colorimetric Detection of *Plasmodium vivax* in Urine Using MSP10 Oligonucleotides and Gold Nanoparticles. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(10):e0005029.
129. Akiyama Y, Wang G, Shiraishi S, Kanayama N, Takarada T, Maeda M. Rapid Naked-Eye Discrimination of Cytochrome P450 Genetic Polymorphism through Non-Crosslinking Aggregation of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *ChemistryOpen*. 2016;5(6):508-12.

130. Shawky SM, Awad AM, Allam W, Alkordi MH, El-Khamisy SF. Gold aggregating gold: A novel nanoparticle biosensor approach for the direct quantification of hepatitis C virus RNA in clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;92:349-56.
131. Hu B, Guo J, Xu Y, Wei H, Zhao G, Guan Y. A sensitive colorimetric assay system for nucleic acid detection based on isothermal signal amplification technology. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2017;409(20):4819-25.
132. Kong C, Wang Y, Fodjo EK, Yang G-x, Han F, Shen X-s. Loop-mediated isothermal amplification for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* using gold nanoparticles . *Microchimica Acta*. 2018;185(1):35.
13. Zaher MR, Ahmed HA, Hamada KE, Tammam RH. Colorimetric Detection of Unamplified Rift Valley Fever Virus Genetic Material Using Unmodified Gold Nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2018;184(3):908-898.
134. He H, Dai J, Meng Y, Duan Z, Zhou C, Zheng B, et al. Self-assembly of DNA nanoparticles through multiple catalyzed hairpin assembly for enzyme-free nucleic acid amplified detection. *Talanta*. 2018;179:641-5.
135. Baetsen-Young AM, Vasher M, Matta LL, Colgan P, Alocilja EC, Day B. Direct colorimetric detection of unamplified pathogen DNA by dextrin-capped gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;101:29-36.
136. Hill HD, Mirkin CA. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature protocols*. 2006;1(1):324.
137. Lytton-Jean AK, Mirkin CA. A thermodynamic investigation into the binding properties of DNA functionalized gold nanoparticle probes and molecular fluorophore probes. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(37):12754-5.
138. Zu Y, Ting AL, Gao Z. Visualizing Low-Level Point Mutations: Enzyme-like Selectivity Offered by Nanoparticle Probes. *Small*. 2011;7(3):306-10.
139. Zhang X, Servos MR, Liu J. Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles. *Langmuir*. 2012;28(8):3896-902.
140. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*. 1973;241(105):20.
141. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Analytical chemistry*. 1995;67(4):735-43.
142. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;58(1):3-7.

143. Costa P, Amaro A, Botelho A, Inácio J, Baptista PV. Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(9):1464-9.
144. VS AP, Joseph P, SCG KD, Lakshmanan S, Kinoshita T, Muthusamy S. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:1231-45.
145. Hu M, Chen J, Li Z-Y, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 2006;35(11):1084-94.
146. Kim D-J, Kim K-S. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 2011;42(3):207-27.
147. Lee J-H, Cho H-Y, Choi HK, Lee J-Y, Choi J-W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7).
148. Jans H, Huo Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(7):2849-66.
149. Wang Q, Liu R, Yang X, Wang K, Zhu J, He L, et al. Surface plasmon resonance biosensor for enzyme-free amplified microRNA detection based on gold nanoparticles and DNA supersandwich. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;223:613-20.
150. Denomme RC, Young Z, Brock L, Nieva PM, Vijayan M, editors. Optimization of a localized surface plasmon resonance biosensor for heat shock protein 70. *Photonic and Phononic Properties of Engineered Nanostructures II*; 2012: International Society for Optics and Photonics.
151. Mesch M, Weiss T, Schäferling M, Hentschel M, Hegde RS, Giessen H. Highly Sensitive Refractive Index Sensors with Plasmonic Nanoantennas– Utilization of Optimal Spectral Detuning of Fano Resonances. *ACS sensors*. 2018;3(5):960-6.
152. Zhu Q, Li T, Ma Y, Wang Z, Huang J, Liu R, et al. Colorimetric detection of cholic acid based on an aptamer adsorbed gold nanoprobe. *RSC Advances*. 2017;7(31):19250-6.
153. Pylaev T, Khanadeev V, Khlebtsov B, Dykman L, Bogatyrev V, Khlebtsov N. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanospheres: a comparative study with gold nanorods. *Nanotechnology*. 2011;22(28):285501.
154. Miao XM, Xiong C, Wang WW, Ling LS, Shuai XT. Dynamic-Light-Scattering-Based Sequence-Specific Recognition of Double-Stranded DNA with Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Chemistry–A European Journal*. 2011;17(40):11230-6.
155. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120(9):1959-64.

156. Mehrdel B, Aziz AA, Yoon T, Lee S. Effect of chemical interface damping and aggregation size of bare gold nanoparticles in NaCl on the plasmon resonance damping. *Optical Materials Express*. 2017;7(3):955-66.
157. Olson J, Dominguez-Medina S, Hoggard A, Wang L-Y, Chang W-S, Link S. Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(1):40-57.
158. Lin E-H, Tsai W-S, Lee K-L, Lee M-CM, Wei P-K. Enhancing detection sensitivity of metallic nanostructures by resonant coupling mode and spectral integration analysis. *Optics express*. 2014;22(16):19621-32.
159. Lee K-L, Wei P-K, editors. Fano resonances in capped metallic nanostructures for highly sensitive plasmonic sensors. *Advanced Environmental, Chemical, and Biological Sensing Technologies XIV*; 2017: International Society for Optics and Photonics.
160. Nelson EM, Rothberg LJ. Kinetics and mechanism of single-stranded DNA adsorption onto citrate-stabilized gold nanoparticles in colloidal solution. *Langmuir*. 2011;27(5):177.
161. Seetang-Nun Y, Jaroenram W, Sriurairatana S, Suebsing R, Kiatpathomchai W. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Molecular and cellular probes*. 2013;27(2):71-9.

## **Colorimetric-based method for the detection of ureaplasma urealyticum using gold nanoparticles**

### **Background:**

The importance of identifying the *ureaplasma urealyticum* bacteria gets interesting owing to its prominent role in providing the base of the genesis of the STDs particularly infertility and spontaneous abortion. Despite the existence of a number of conventional diagnostic procedures such as cultivation or molecular methods to detection of this bacterium the Low sensitivity, timeliness and high cost of some of these methods assigned as their limitations. Thereby it requires the need for developing an appropriate alternative diagnostic method. In this study a gold nanoparticle-based DNA sensor was applied as a diagnostic tool, which in that the possibility of visual and spectral analysis of aggregated and non-aggregated states of gold nanoparticles (GNPs), is taken as basis of the detection approach.

**Method:** In this assay the GNPs after synthesis were conjugated with a thiol probe with a specific sequence to the target DNA (urease amplicon from the plasmid vector). Next the conjugates were used to evaluation of the gradient concentrations of the target sequence (10-60 ng). The visual color changing and spectral analysis Includes variations in the plasmon peak position, Full width at half maximum (FWHM), aggregation ratio of GNPs and peak intensity were used for interpretation of the results.

**Findings:** The color stability as well as low aggregation ratio of positive mixtures even in the lowest concentration demonstrated the capability of nanoprobe in detection of the target DNA. The limit of detection was between 10-60 ng. In this range, by reducing the concentration, the low rate of hybridization resulted in slight increase in the aggregation ratio of nanoprobe, FWHM, decrease in peak intensity, and the relative color changing. The variations followed a dose dependent manner. In contrast the negative control and non-complementary amplicon due to lack of target-nanoprobe showed a significant increase in aggregation ratio, FWHM and red shifted to the longer wavelength. Also the color was completely changed to gray. The differences between positive samples and negative control showed a significant value ( $P < 0.0001$ )

**Conclusion:** Current method by possessing desire sensitivity and specificity with a limit of detection of 10 ng in the case of this study could provide a fast, low cost and low equipped method.

**Keywords:** Ureaplasma urealyticum, Gold nanoparticles, Colorimetric detection







Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Paramedical sciences

Thesis submitted for the degree of MSc in medical of biotechnology

Title:

Colorimetric-based method for detection of *ureaplasma urealyticum*  
using gold nanoparticles

Supervisor:

Dr. Hossein Ahmadpour-Yazdi

Advisors:

Dr. Amir Peymani

By:

Nahid Ghorbanzadeh

September 2018

## Abstract

The importance of identifying the *ureaplasma urealyticum* bacteria gets interesting owing to its prominent role in providing the base of the genesis of the STDs particularly infertility and spontaneous abortion. Despite the existence of a number of conventional diagnostic procedures such as cultivation or molecular methods to detection of this bacterium the Low sensitivity, timeliness and high cost of some of these methods assigned as their limitations. Thereby it requires the need for developing an appropriate alternative diagnostic method. In this study a gold nanoparticle-based DNA sensor was applied as a diagnostic tool, which in that the possibility of visual and spectral analysis of aggregated and non-aggregated states of gold nanoparticles (GNPs), is taken as basis of the detection approach.

**Method:** In this assay the GNPs after synthesise were conjugated with a thiol probe with a specific sequence to the target DNA (urease amplicon from the plasmid vector). Next the conjugates were used to evaluation of the gradient concentrations of the target sequence (10-60 ng). The visual color changing and spectral analysis Includes variations in the plasmon peak position, Full width at half maximum (FWHM), aggregation ratio of GNPs and peak intensity were used for interpretation of the results.

**Findings:** The color stability as well as low aggregation ratio of positive mixtures even in the lowest concentration demonstrated the capability of nanoprobe in detection of the target DNA. The limit of detection was between 10-60 ng. In this range, by reducing the concentration, the low rate of hybridization resulted in slight increase in the aggregation ratio of nanoprobe, FWHM, decrease in peak intensity, and the relative color changing. The variations followed a dose dependent manner. In contrast the negative control and non-complementary amplicon due to lack of target-nanoprobe showed a significant increase in aggregation ratio, FWHM and red shifted to the longer wavelength. Also the color was completely changed to gray. The differences between positive samples and negative control showed a significant value ( $P < 0.0001$ )

**Conclusion:** Current method by possessing desire sensitivity and specificity with a limit of detection of 10 ng in the case of this study could provide a fast, low cost and low equipped method.